

# Der Effekt des Sertoli Zell-spezifischen Knockouts von Connexin43 auf die testikuläre Genexpression in der präpubertären Maus

---

**SARAH GIESE**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Ralph Brehm

**Der Effekt des Sertoli Zell-spezifischen Knockouts von  
Connexin43 auf die testikuläre Genexpression  
in der präpubertären Maus**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität

Eingereicht von

**Sarah Giese**  
Tierärztin aus Duisburg

Gießen (2012)  
Gefördert durch Deutsche Forschungsgemeinschaft  
(BR 3365/2-1 und KFO 181/1)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Brehm

Prof. Dr. Gerhard Schuler

Tag der Disputation: 04.06.2012

*Meinen Eltern*

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>X</b>
<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XX</b>
<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>XXI</b>
<b>1 LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Histologischer Aufbau des Hodens und normale Spermatogenese .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aufbau des Keimepithels (Epithelium spermatogenicum) .....	1
1.1.1.1 Die KZ und Ablauf der KZ-Reifung .....	1
1.1.1.1.1 Zeitliches Auftreten der verschiedenen KZ-Populationen bei der Maus.....	3
1.1.1.1.2 Stadien- und KZ- spezifische Genexpression.....	3
1.1.1.1.3 Regulation der KZ-Reifung .....	4
1.1.1.2 Die SZ, ihre Funktionen und die Blut-Hoden-Schranke .....	5
1.1.1.2.1 Die SZ-Differenzierung .....	6
1.1.1.2.2 Regulation von Proliferation und Differenzierung der SZ .....	7
1.1.1.2.3 Differenzierungsmarker der SZ .....	8
1.1.1.2.4 Morphologische Veränderungen der SZ.....	9
1.1.2 Das interstitielle Gewebe .....	10
<b>1.2 Störungen der Spermatogenese.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Hypospermatogenese .....	11

1.2.2	Spermatogeneseearreste .....	11
1.2.3	SCO-Syndrom .....	12
<b>1.3</b>	<b>Zellverbindungen und Blut-Hoden-Schranke .....</b>	<b>12</b>
1.3.1	GJ .....	14
1.3.1.1	Aufbau der GJ .....	14
1.3.1.2	Aufbau der Connexone.....	15
1.3.1.3	Cx - Die Proteine der GJ .....	16
1.3.1.3.1	Nomenklatur der Cx .....	16
1.3.1.3.2	Aufbau eines Cx .....	17
1.3.1.3.3	Aufbau des Cx-Gens.....	18
1.3.1.3.4	Cx43.....	19
1.3.2	Bildung von GJ-Kanälen.....	19
1.3.3	Abbau von GJ-Kanälen .....	20
1.3.4	Regulation der GJIC.....	20
1.3.4.1	Regulation der Cx-Expression .....	21
1.3.4.1.1	Transkriptionskontrolle .....	21
1.3.4.1.2	Epigenetische Mechanismen .....	22
1.3.4.1.3	Post-Transkriptionelle Regulation.....	22
1.3.4.2	Regulation des Öffnungszustandes von GJ-Kanälen .....	23
1.3.5	GJ und Cx im Hoden.....	23

1.3.5.1	GJ und Cx im Hoden mit normaler Spermatogenese .....	23
1.3.5.1.1	Räumliche Expression von GJ und verschiedenen Cx .....	24
1.3.5.1.2	Zeitliche Expression von GJ und Cx43 .....	25
1.3.6	GJ, Cx und ihre Funktion(en) im Hoden .....	26
1.3.6.1	GJ und Cx im Hoden und Störungen der Spermatogenese .....	27
1.3.6.2	Regulation der GJIC und der Cx-Expression in den SZ .....	27
<b>1.4</b>	<b>KO und Knockin(KI) Modelle .....</b>	<b>28</b>
1.4.1	Cx-KO und KI-Modelle .....	29
1.4.1.1	Auswirkungen von CxKO auf die Embryonalentwicklung .....	29
1.4.2	CxKO-Mäuse und Spermatogenese .....	30
1.4.3	SZ-spezifischer KO von Cx43(SCCx43KO) .....	31
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Material/ Gewebe .....</b>	<b>33</b>
2.1.1	SCCx43KO-Mäuse und WT-Mäuse .....	33
2.1.1.1	Gewinnung des Schwanzbiopsats .....	33
2.1.1.2	Hodengewebsentnahme und Bestimmung des Hodengewichtes .....	33
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>34</b>
2.2.1	Behandlung der Mäuseschwanzbiopsien und DNA-Extraktion.....	34
2.2.2	Genotypisierung der genutzten Mäuse .....	35
2.2.2.1	PCR zur Detektion der Cre-Rekombinase „Cre PCR“ .....	35
2.2.2.2	PCR zur Detektion der LoxP-Elemente „Flox-PCR“ .....	36



2.2.2.3	Gelelektrophorese der Cre- und Flox-PCR-Produkte .....	37
2.2.2.3.1	Erstellen eines Agarose-Gels .....	38
2.2.2.3.2	Vorbereitung der PCR-Produkte und des Markers .....	38
2.2.2.3.3	Auftrennung der PCR-Produkte und Dokumentation .....	39
2.2.3	Gefrorenes Gewebe .....	39
2.2.4	Paraffin-eingebettetes Gewebe .....	39
2.2.4.1	Fixation in Bouin'scher Lösung .....	40
2.2.4.2	Fixation in Formalin .....	40
2.2.4.3	Einbettung der Proben in Paraffin .....	40
2.2.4.4	APES-Beschichtung der Objektträger (OT) .....	41
2.2.4.5	Herstellung histologischer Schnitte .....	42
2.2.4.6	HE-Färbung .....	42
2.2.4.7	Lichtmikroskopie und quantitative Bestimmung der SZ- und KZ-Zahl je Tubulus .....	43
2.2.4.8	Statistische Auswertung der erhobenen Daten (Zellzahlen) .....	43
2.2.5	Allgemeine Vorbemerkung zur IHC .....	44
2.2.6	$\beta$ -Galaktosidase-IHC .....	45
2.2.7	Extraktion und Isolation von RNA aus Gefriermaterial .....	49
2.2.7.1	Stabilisierung der RNA .....	49
2.2.7.2	Extraktion der RNA .....	49
2.2.7.2.1	Extraktion .....	51
2.2.7.2.2	Messung des RNA-Gehaltes und Kontrolle der RNA-Qualität .....	52

2.2.8	Microarray .....	53
2.2.8.1	Allgemeine Vorbemerkungen zur Microarray-Analyse.....	53
2.2.8.2	Verwendete Proben .....	53
2.2.8.3	Herstellung von markierter cRNA .....	53
2.2.8.4	Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung auf dem Array .....	55
2.2.8.5	Waschungen und Färbung mit Fluorophoren .....	55
2.2.8.6	Scan des IF-Signal, Hintergrundkorrektur und Intra-Array Normalisierung ...	55
2.2.8.7	Weitere Auswertung und Qualitätskontrolle der Daten .....	56
2.2.8.7.1	Statistische Auswertung der Daten .....	57
2.2.8.7.2	Funktionelle Auswertung der Daten .....	58
2.2.8.7.3	Clusteranalyse.....	58
2.2.8.7.4	Pathway-Analyse der Daten .....	59
2.2.9	RT-PCR.....	61
2.2.9.1	Überprüfung der RT-PCR und des DNase Verdaus .....	62
2.2.9.2	Aufreinigung der cDNA.....	64
2.2.10	qRT-PCR.....	65
2.2.10.1	Auswahl der Primerpaare für die qRT-PCR .....	65
2.2.10.2	Erstellung der cDNA-Verdünnungsreihe .....	65
2.2.10.3	Vergleich der Genexpression in der qRT-PCR .....	67
2.2.10.4	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	69
2.2.10.5	Statistische Auswertung der qRT-PCR-Daten .....	70
2.2.11	Bestimmung der Korrelation zwischen Microarray-Daten und qRT-PCR-Ergebnissen .....	71

2.2.12	IHC zur Bestätigung der Ergebnisse der Microarray-Analyse und qRT-PCR.....	72
2.2.12.1	Cx43-IHC .....	72
2.2.12.2	Occludin-IHC .....	74
2.2.12.3	Amh-IHC.....	75
2.2.12.4	Stra8-IHC .....	75
2.2.12.5	Dazl-IHC .....	76
2.2.12.6	Lichtmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion .....	78
2.2.13	IF .....	78
2.2.13.1	Allgemeine Vorbemerkungen zur IF.....	78
2.2.13.2	IF von Dmrt7 .....	78
2.2.13.3	Detektion des IF-Signals und Auswertung der Immunreaktion.....	80
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1</b>	<b>Genotypisierungen .....</b>	<b>81</b>
3.1.1	PCR .....	81
3.1.1.1	Cre-PCR .....	81
3.1.1.2	Flox-PCR.....	83
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung des relativen Hodengewichtes .....</b>	<b>84</b>
<b>3.3</b>	<b>Evaluation von HE gefärbten Schnitten.....</b>	<b>84</b>
3.3.1	WT-Mäuse.....	85
3.3.2	SCCx43KO-Mäuse.....	86
<b>3.4</b>	<b>Morphometrische Bestimmung der SZ- und KZ-Zahl.....</b>	<b>86</b>
<b>3.5</b>	<b>β-Galaktosidase-IHC.....</b>	<b>87</b>

3.5.1	WT-Mäuse.....	88
3.5.2	SCCx43KO-Mäuse.....	89
<b>3.6</b>	<b>Microarray-Analyse .....</b>	<b>90</b>
3.6.1	Signifikant regulierte Gene .....	90
3.6.2	GO-Analyse.....	91
3.6.3	KZ-spezifische Gene .....	93
3.6.4	Pathway-Analyse.....	94
3.6.4.1	Funktionelle Analyse des gesamten Datensatzes .....	94
3.6.4.2	„Network“-Bildung .....	94
3.6.4.3	Korrelation zwischen den signifikant regulierten Genen und Cx43 .....	97
3.6.4.4	Self-made Pathways .....	98
3.6.4.5	Canonical Pathways .....	98
<b>3.7</b>	<b>RT-PCR.....</b>	<b>100</b>
<b>3.8</b>	<b>qRT-PCR.....</b>	<b>101</b>
3.8.1	cDNA-Verdünnungsreihe.....	102
3.8.1.1	Ergebnis der qRT-PCR.....	104
3.8.2	Korrelation FC Microarray-Analyse und FC qRT-PCR .....	105
<b>3.9</b>	<b>IHC-Färbungen ausgewählter Gene.....</b>	<b>105</b>
3.9.1	Cx43-IHC .....	105
3.9.1.1	WT-Mäuse.....	106
3.9.1.2	SCCx43KO-Mäuse.....	107

3.9.2	Occludin-IHC .....	108
3.9.2.1	WT-Mäuse.....	108
3.9.2.2	SCCx43KO-Mäuse.....	109
3.9.3	Amh-IHC.....	110
3.9.3.1	WT-Mäuse.....	110
3.9.3.2	SCCx43KO-Mäuse.....	111
3.9.4	Stra8-IHC .....	111
3.9.4.1	WT-Mäuse.....	112
3.9.4.2	SCCx43KO-Mäuse.....	113
3.9.5	Dazl-IHC .....	113
3.9.5.1	WT-Mäuse.....	114
3.9.5.2	SCCx43KO-Mäuse.....	115
<b>3.10</b>	<b>IF von Dmrt7 .....</b>	<b>116</b>
3.10.1.1	WT-Mäuse.....	116
3.10.1.2	SCCx43KO-Mäuse.....	117
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>118</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss der Cx43-Deletion in SZ auf die Zellzusammensetzung und Hodenmorphologie .....</b>	<b>118</b>
4.1.1	Einfluss der Cx43-Deletion auf die SZ-Zahl.....	118
<b>4.2</b>	<b>Einfluss der Cx43-Deletion auf die KZ-Zahl .....</b>	<b>119</b>
<b>4.3</b>	<b>Von der Cx43-Deletion betroffene Gene .....</b>	<b>120</b>
<b>4.4</b>	<b>Funktionskategorien der signifikant regulierten Gene.....</b>	<b>120</b>

4.5	KZ-spezifische Gene der Spermatogenese .....	121
4.6	Pathway-Analyse der signifikant regulierten Gene .....	124
4.7	Netzwerk-Analyse der signifikant regulierten Gene.....	125
4.8	Canonical Pathway-Analyse der signifikant regulierten Gene .....	126
4.9	Cx43 und die Blut-Hoden-Schranke.....	127
4.10	Retinsäure und Cx43.....	127
4.11	Cx43 und Dazl.....	129
4.12	Die Dm-Genfamilie und Cx43 .....	130
4.13	Weitere signifikant regulierte Gene und Cx43 .....	130
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	133
6	SUMMARY.....	135
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	137
8	BEZUGSQUELLEN .....	153
8.1	Stoffe und Reagenzien.....	153
8.2	Sonstiges Material .....	157
8.3	Geräte .....	158
8.4	Software.....	160
9	LISTE DER SIGNIFIKANT VERÄNDERTEN GENE.....	161
	ERKLÄRUNG .....	184
	DANKSAGUNG.....	185

## Veröffentlichungen

In die mit \* markierten Veröffentlichungen sind Teile dieser Arbeit mit eingegangen.

### Artikel:

D. Carette, K. Weider, J. Gilleron, **S. Giese**, J. Dompierre, M. Bergmann, R. Brehm, J. P. Denizot, D. Segretain. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol* 2010; 346, 54-67.

K. Weider, M. Bergmann, **S. Giese**, F. Guillou, K. Failing, R. Brehm. Altered differentiation and clustering of Sertoli cells in transgenic mice showing a Sertoli cell specific knockout of the connexin 43 gene (SCCx43KO). *Differentiation* 2011; 82(1):38-49.

\* **S. Giese**, H. Hossain, M. Markmann, T. Chakraborty, S. Tchatalbachev, F. Guillou, M. Bergmann, K. Failing, K. Weider, R. Brehm. A Sertoli cell specific Knockout of Connexin 43 leads to multiple alterations in testicular gene expression in prepubertal mice. *Dis Model Mech* 2012 (under revision).

### Abstracts:

\* **S. Giese**, H. Hossain, B. Izar, T. Chakraborty, S. Tchatalbachev, K. Willecke, F. Guillou, M. Cavalcanti, M. Bergmann, R. Brehm. The effect of a Sertoli cell-specific knockout of connexin 43 on testicular gene expression in prepubertal mice. *Reprod Domest Anim* 2010; 45, 14.

\* **S. Giese**, H. Hossain, B. Izar, T. Chakraborty, S. Tchatalbachev, K. Willecke, F. Guillou, M. Bergmann, R. Brehm. The effect of a Sertoli cell-specific knockout of connexin 43 on testicular gene expression in prepubertal mice. DOI 10.3337/anatges.2010.0010;41

\* **S. Giese**, H. Hossain, B. Izar, T. Chakraborty, S. Tchatalbachev, K. Willecke, F. Guillou, M. Bergmann, R. Brehm. The effect of a Sertoli cell-specific knockout of connexin 43 on testicular gene expression in prepubertal mice. *Anat Histol Embryol* 2010; 39, 269-270.

## Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin Biotin Complex
ABP	Androgen-bindendes Protein
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Amh	Anti-Müller-Hormon
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	Einfach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxy-Ende eines Peptids
ca.	Circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy-DNA
C	Cytosin



CIS	<b>C</b> arcinoma <b>in situ</b>
Ck	Cytokeratin(e)
CL	Zytoplasmatische Schleife eines Connexins
Cre	<b>ca</b> uses <b>re</b> combination
Cx	Connexin
C-Terminus	<b>C</b> arboxy-Ende eines Peptids
d	day (Tag)
Da	Dalton
DAB	<b>D</b> iamin <b>o</b> benzidin
DEPC	<b>D</b> iethyl <b>p</b> yrocarbonat
d.h.	<b>d</b> as <b>h</b> eißt
DNA (DNS)	<b>D</b> esoxyribonukleinsäure
DNase	<b>D</b> esoxyribonukle <b>ase</b>
dNTP	<b>d</b> esoxy-Ribonucleosidtriphosphat
DTT	<b>D</b> ithio <b>th</b> reitol
EDTA	<b>E</b> thylend <b>ia</b> mintetraessigsäure
ER	<b>E</b> ndoplasmatisches <b>R</b> etikulum
ES	extrazelluläre <b>S</b> chleife
etc.	<b>E</b> t cetera

FSH	<b>F</b> ollikel-stimulierendes <b>H</b> ormon
FC	Fold change
g	<b>G</b> ramm
G	<b>G</b> uanin
GJ	<b>G</b> ap <b>J</b> unction
GJIC	<b>G</b> ap junctional intercellular communication (Gap Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation)
GnRH	<b>G</b> onadotropin <b>R</b> eleasing <b>H</b> ormone
GO	<b>G</b> ene <b>O</b> ntology
GTP	<b>G</b> uanosin <b>t</b> riphosphat
°C	Grad <b>C</b> elsius
h	Stunde ( <b>h</b> our)
HE	<b>H</b> ämatoxylin- <b>E</b> osin
IF	<b>I</b> mmun <b>f</b> luoreszenz
IHC	<b>I</b> mmun <b>h</b> istochemie
IPA	<b>I</b> ngenuity <b>P</b> athway <b>A</b> nalysis System
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (internal ribosomal entry site)
kb	<b>K</b> ilobasenpaare (1000bp)
KI	<b>K</b> nockin

KO	<b>K</b> nockout
KZ	<b>K</b> eimzelle
l	<b>L</b> iter
LH	<b>L</b> uteinisierendes <b>H</b> ormon
LoxP	<b>l</b> ocus <b>o</b> f <b>X</b> -ing over
M	Transmembrandomäne
mA	<b>M</b> illiampere
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mg	<b>M</b> illigramm
ml	<b>M</b> illiliter
mM	<b>M</b> illimolar
mRNA	Boten ( <b>m</b> essenger)-RNA
MW (MG)	<b>M</b> olekulargewicht
N-Terminus	Aminoterminus eines Peptids
NCBI	<b>N</b> ational <b>c</b> enter for <b>b</b> io <b>t</b> echnology <b>i</b> nformation
nm	<b>N</b> anom <b>e</b> ter
uORFs	Offene Leserahmen ( <b>u</b> pstram <b>o</b> pen <b>r</b> eading <b>f</b> rames)
OT	<b>O</b> bjektträger
PAGE	<b>P</b> olyacrylamid- <b>G</b> e <b>e</b> lektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („ <b>Phosphate buffered saline</b> “)
PCR	Polymerasekettenreaktion („ <b>Polymerase chain reaction</b> “)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
p.p.	<b>p</b> ost <b>p</b> artum
qRT-PCR	semi <b>q</b> uantitative <b>real-time P</b> olymerase <b>K</b> etten <b>r</b> eaktion
Raf	<b>r</b> apid growing <b>f</b> ibrosarcoma
Ras	<b>R</b> attensarkomvirus (Proto-Onkogen)
rER	<b>r</b> auhes <b>E</b> ndoplasmatisches <b>R</b> etikulum
RNA (RNS)	<b>R</b> ibonukleinsäure
RNase	<b>R</b> ibonuklease
rRNA	<b>r</b> ibosomale Ribonukleinsäure
RT	<b>R</b> aum <b>t</b> emperatur
RT-PCR	<b>R</b> everse <b>T</b> ranskriptase <b>P</b> olymerase <b>K</b> etten <b>r</b> eaktion
RXR	<b>R</b> etinoid <b>X</b> <b>R</b> ezeptor
SC (SZ)	Sertoli cell (Sertoli Zelle)
SCO	<b>S</b> ertoli- <b>C</b> ell- <b>O</b> nly
SDS	Natrium ( <b>S</b> odium) <b>d</b> odecylsulfat
siRNA	<b>s</b> mall <b>i</b> nterfering <b>R</b> ibonukleinsäure  (kleine interagierende Ribonukleinsäure)

SKNN	sequential <b>K</b> -nearest neighbour imputation
s.o.	siehe oben
src	<b>R</b> ous sarcoma virus (Proto-Onkogen)
T	<b>T</b> hymine
TAE	<b>T</b> ris- <b>A</b> acetat- <b>E</b> DTA-Puffer
TGF	<b>T</b> ransforming <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
TIN	<b>T</b> estikuläre intraepitheliale Neoplasie
Tris	<b>T</b> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheiten ( <b>U</b> nit)
Upm	<b>U</b> mdrehungen <b>p</b> ro <b>M</b> inute
UTP	<b>U</b> ridin <b>t</b> ri <b>p</b> hosfat
UTR	<b>u</b> ntranslatierte <b>R</b> egion
UV	<b>U</b> ltraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum <b>B</b> eispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromolar

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf der Spermatogenese .....	2
Abbildung 2: Hormonelle Steuerung der Spermatogenese. ....	4
Abbildung 3: Adulte SZ mit ihren unterschiedlichen Funktionen und verschiedenen KZ-Populationen im Keimepithel.....	6
Abbildung 4: Adulte Maus mit normaler Spermatogenese.....	10
Abbildung 5: SZ-SZ-Verbindungskomplexe im Keimepithel. ....	13
Abbildung 6: Aufbau eines GJ-Plaques .....	14
Abbildung 7: Connexone und ihre verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten.....	16
Abbildung 8: Aufbau eines Cx-Proteins. ....	17
Abbildung 9: Struktur des Maus-Cx43-Gens .....	18
Abbildung 10: Bildung und Abbau von Cx und GJ-Kanälen. ....	19
Abbildung 11: Repräsentative Cx43-IHC einer adulten Maus. ....	25
Abbildung 12: Kreuzungsschema einer konditionellen KO-Mauslinie. ....	28
Abbildung 13: Phänotyp von einer adulten WT-Maus (A) und einer adulten SCCx43KO-Maus (B).....	32
Abbildung 14: Überblick über die verwendeten Methoden. ....	34
Abbildung 15: Schema der ABC Methode. ....	44
Abbildung 16: Schema der WT-Genstruktur und dem geflochten Genkonstrukt.....	45
Abbildung 17: Ablauf der Microarray-Analyse. ....	54

Abbildung 18: Auswertung des Microarray-Experiments. ....	57
Abbildung 19: Repräsentatives Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese der Cre-PCR-Produkte. ....	82
Abbildung 20: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der Flox-PCR-Produkte. ....	83
Abbildung 21: Relatives Hodengewicht. ....	84
Abbildung 22: Repräsentative HE-Färbung einer acht Tage alten WT-Maus .....	85
Abbildung 23: Repräsentativer HE-gefärbter Schnitt einer acht Tage alten SCCx43KO-Maus. ....	86
Abbildung 24: Ergebnis der quantitativen Evaluation der Keimtubuli in HE-gefärbten Schnitten.....	87
Abbildung 25: Repräsentative $\beta$ -Galaktosidase-IHC einer acht Tage alten WT-Maus. ....	88
Abbildung 26: Repräsentative $\beta$ -Galaktosidase-IHC einer acht Tage alten SCCx43KO-Maus. ....	89
Abbildung 27: Hierarchisches Cluster und Heatplot der signifikant regulierten Gene.....	90
Abbildung 28: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der $\beta$ -Aktin-PCR mit den Produkten der RT-PCR.....	100
Abbildung 29: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese dreier getesteter Primerpaare. ....	101
Abbildung 30: Repräsentative cDNA-Verdünnungsreihe am Beispiel von Hsp90ab1. ....	102
Abbildung 31: Repräsentative Schmelzkurve von Hsp90ab1.....	103
Abbildung 32: Genexpressionsvergleich am Beispiel von Dmrt6 zwischen einer WT-Maus und einer SCCx43KO-Maus. ....	104

Abbildung 33: Die relative Genexpression der WT-Mäuse und der SCCx43KO-Mäuse im Vergleich. ....	105
Abbildung 34: Repräsentative Cx43-IHC einer WT-Maus.....	106
Abbildung 35: Repräsentative Cx43-IHC einer SCCx43KO-Maus. ....	107
Abbildung 36: Repräsentative Occludin-IHC einer WT-Maus.....	108
Abbildung 37: Repräsentative Occludin-IHC einer SCCx43KO-Maus.....	109
Abbildung 38: Repräsentative Amh-IHC einer WT-Maus. ....	110
Abbildung 39: Repräsentative Amh-IHC einer SCCx43KO-Maus. ....	111
Abbildung 40: Repräsentative Stra8-IHC einer WT-Maus.....	112
Abbildung 41: Repräsentative Stra8-IHC einer SCCx43KO-Maus.....	113
Abbildung 42: Repräsentative Dazl-IHC einer WT-Maus.....	114
Abbildung 43: Repräsentative Dazl-IHC einer SCCx43KO-Maus.....	115
Abbildung 44: Repräsentative Dmrt7-IF einer WT-Maus. ....	116
Abbildung 45: Repräsentative Dmrt7-IF einer SCCx43KO-Maus.....	117



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Für die Genotypisierung verwendete Primer. ....	35
Tabelle 2: Belegungsschema Verdünnungsreihe. ....	66
Tabelle 3: Belegungsplan für einen Genexpressionsvergleich. ....	68
Tabelle 4: In der qRT-PCR verwendete Primersequenzen. ....	68
Tabelle 5: Durchgeführte IHC.....	77
Tabelle 6: Signifikante Funktionskategorien der hochregulierten Gene.....	91
Tabelle 7: Signifikante Funktionskategorien der herunterregulierten Gene. ....	92
Tabelle 8: Netzwerke, in denen signifikant regulierte Gene von Bedeutung sind und ihre Funktionen.....	95
Tabelle 9: Übersicht über die zehn am stärksten beeinflussten Canonical Pathways und der beteiligten, signifikant veränderten Gene.....	98
Tabelle 10: Übersicht über die signifikant regulierten, mit Spermatogenese assoziierten und KZ-spezifischen Gene und deren Bedeutung für die Spermatogenese. ....	122

## Einleitung und Fragestellung

Connexine (Cx) kommen, mit wenigen Ausnahmen wie den Erythrozyten und reifen Spermien, in nahezu allen differenzierten Zellen und Geweben des Körpers vor. Sie stellen die kleinste Einheit von Gap Junction (GJ)-Kanälen dar. Jeweils sechs Cx schließen sich zu einem Halbkanal, dem sogenannten Connexon zusammen, dessen Aufgabe die Bildung von direkten Durchgängen zwischen benachbarten Zellen ist. Jede der beteiligten Zellen stellt hierzu ein Connexon zur Verfügung, die sich zu dem funktionellen Kanal zusammenschließen. Diese Zellverbindungen erlauben den Durchtritt von verschiedenen Signalmolekülen, Ionen und Metaboliten, wodurch eine direkte Kommunikation und Koordination der verschiedenen Zellen eines Gewebes ermöglicht wird.

Einige Krankheiten des Menschen, wie zum Beispiel „Taubheit“ und „Charcot-Marie-Tooth Neuropathien“ konnten als Folgen einer veränderter Expression von Cx-Genen identifiziert werden. Auch im Hoden sind die Expression und Funktion der verschiedenen Cx intensiv erforscht worden. Neben endokrinen und parakrinen Regulationsmechanismen ist die Kommunikation der Zellen des Keimepithels via GJ von großer Bedeutung.

Von besonderem Interesse ist Cx43, welches das dominante Cx im Hoden darstellt. Es wird sowohl von den peritubulären Zellen und Leydigzellen, als auch von Sertoli Zellen (SZ) und Keimzellen (KZ) gebildet. Seine Expression beispielsweise in den SZ ist mit der Initiierung der Spermatogenese und der Bildung der Blut-Hoden-Schranke in der Pubertät assoziiert. Patienten mit Veränderungen der Spermatogenese wie zum Beispiel Sertoli-Cell-Only (SCO) Syndrom, Spermatogonienarrest oder intratubulärem Carcinoma in situ (CIS), zeigen eine deutlich reduzierte oder sogar ausbleibende Expression von Cx43.

Um die Rolle von Cx43 im Hoden genauer zu untersuchen, wurden Knockout(KO)-Mäuse kreiert, denen das genannte Gen fehlt. Generalisierte Cx43KO-Mäuse, in denen das Cx-Gen in allen Zellen des Körpers deletiert ist, sterben direkt nach der Geburt aufgrund einer Herzmissbildung, so dass eine Untersuchung der Spermatogenese nicht möglich ist.

Aus diesem Grund wurde ein konditioneller KO, der zu einer Cx43-Deletion selektiv in den SZ führt, für diese Untersuchungen genutzt. Homozygote, männliche SCCx43KO-Tiere sind phänotypisch normal aber infertil. Die histologische Untersuchung von Hoden erwachsener

Tiere zeigte, dass in dem Großteil der Hodenkanälchen keine normale Spermatogenese stattfindet und keine Spermien im Nebenhoden auffindbar sind. Die Tiere zeigten ein SCO Syndrom und/ oder einen Spermatogonienarrest. Weitere histologische Veränderungen im Hoden adulter Tiere sind ein vakuolig verändertes SZ-Zytoplasma, eine erhöhte Anzahl von SZ, eine reduzierte Anzahl von KZ und eine Leydigzellhyperplasie. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf eine Veränderung der Expression der Gene der Blut-Hoden-Schranke, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene, obgleich diese selbst sich als funktionell intakt darstellt.

Die morphologischen und funktionellen Hodenveränderungen der adulten SCCx43KO-Tiere können vermutlich auf eine Störung der Initiierung der Spermatogenese zurückgeführt werden. Diese beginnt bei der Maus an Tag acht post partum (p.p.) mit dem Erscheinen der Typ B Spermatogonien. Zu diesem Zeitpunkt ist die Morphologie des Hodens zwischen SCCx43KO-Mäusen und Wildtyp (WT)-Tieren noch vergleichbar. Auch das relative Hodengewicht weist an Tag acht p.p. noch keinen signifikanten Unterschied auf. Aus diesen Gründen wurden in diesem Forschungsprojekt in erster Linie acht Tage alte Mäuse untersucht.

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojektes werden folgende Fragen „gestellt“ und im Anschluss diskutiert:

- a) Sind an Tag acht p.p. bereits morphologische Unterschiede zwischen SCCx43KO-Mäusen und WT-Mäusen desselben Alters zu beobachten und wenn ja, in welcher Form zeigen sich diese?
- b) Welche Gene dieser präpubertären Tiere sind durch die Deletion des Cx43-Gens in den SZ und KZ in ihrer Expression beeinflusst?

c) Besteht ein Zusammenhang zwischen den veränderten Genen und dem veränderten Phänotyp der adulten KO-Tiere?

d) Sind die veränderten Gene in bekannte Signalwege eingebunden, deren Beeinträchtigung zu einer gestörten Spermatogenese führt?

Die Bestimmung des Genotyps der verwendeten Mäuse erfolgte zu Versuchsbeginn auf DNA-Ebene mittels PCR (Genotyping) und auf Proteinebene durch immunohistochemischen Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase.

Die quantitative Evaluation der Hodenschnitte erfolgte durch Auswertung Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbter Präparate.

Die Untersuchung und der Vergleich der Hodengewebsproben erfolgte auf mRNA-Ebene durch die Microarray-Analyse, deren Daten durch qRT-PCR mit vorangegangener RT-PCR ausgewählter Kandidatengene bestätigt und ergänzt wurden. Auf Proteinebene wurden die Untersuchungen ausgewählter Gene durch Immunhistochemie (IHC) oder Immunfluoreszenz (IF) durchgeführt.

# 1 Literaturübersicht

## 1.1 Histologischer Aufbau des Hodens und normale Spermatogenese

Der Hoden erfüllt im Wesentlichen zwei Aufgaben: Zum einen die Bereitstellung von Samenzellen (Spermatogenese) zum anderen die Produktion von männlichen Sexualhormonen (Steroidsynthese). Der Terminus Spermatogenese beschreibt und beinhaltet dabei alle Prozesse der Samenzellproduktion, während die Steroidsynthese sich auf alle enzymatischen Reaktionen bezieht, die zu einer Produktion von männlichen Sexualhormonen führen. Die beiden Prozesse finden in unterschiedlichen Kompartimenten des Hodens statt. Man unterscheidet das tubuläre Kompartiment, welches von den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) gebildet wird und das interstitielle Kompartiment, welches die Testosteron produzierenden Leydigzellen beheimatet (Meinhardt 2006).

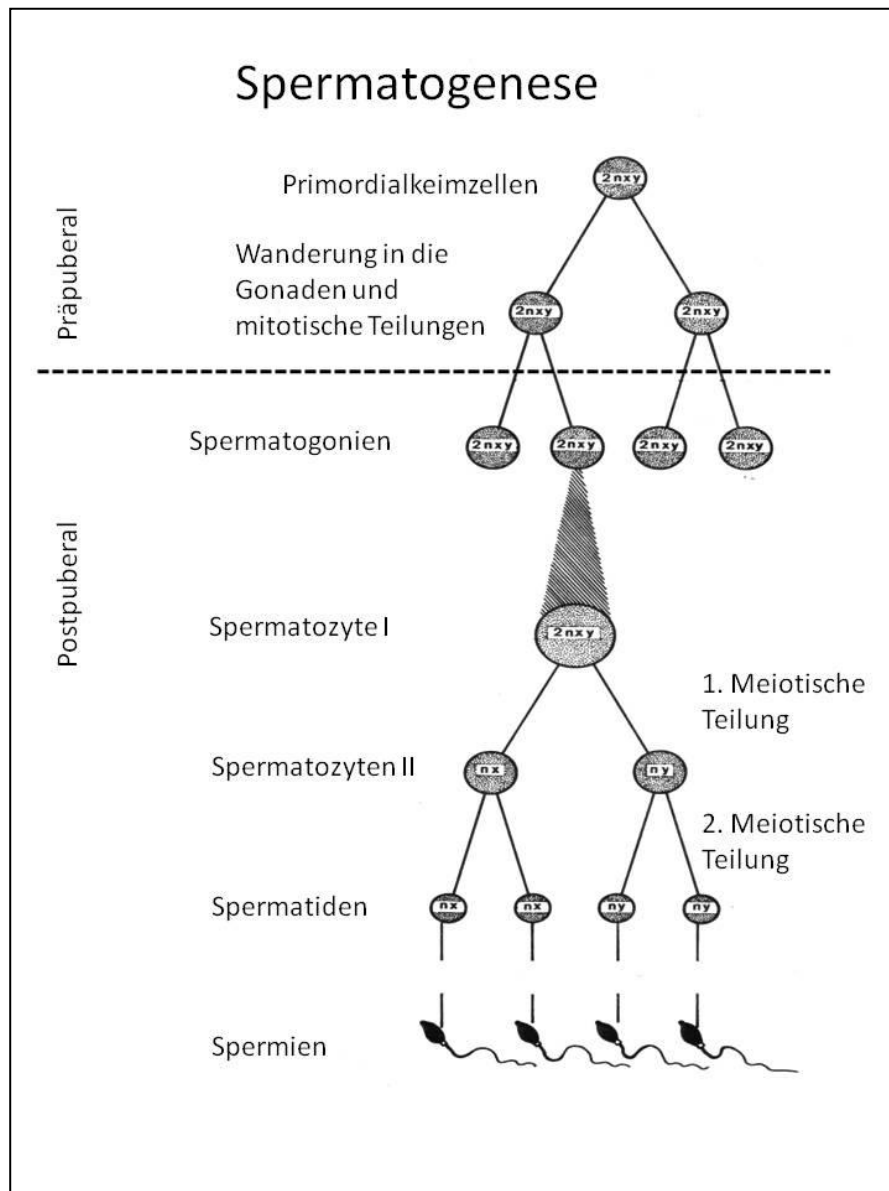
### 1.1.1 Aufbau des Keimepithels (Epithelium spermatogenicum)

Das Keimepithel besteht aus den KZ mit ihren unterschiedlichen Reifestadien und den somatischen SZ. Es kleidet die Samenkanälchen aus, die von einer Lamina propria umschlossen werden. Diese beinhaltet als innerste Schicht die Basalmembran, die durch kollagene und elastische Fasern mit den flachen peritubulären Zellen verbunden ist. Durch ihre Kontraktionsfähigkeit können sich die peritubulären Zellen an der Spermiation, d.h. an der Entlassung der reifen Spermien aus dem Verbund des Epithels ins Tubuluslumen beteiligen (Wrobel und Bergmann 2006).

#### 1.1.1.1 Die KZ und Ablauf der KZ-Reifung

Die in dem Keimepithel befindlichen, unterschiedlichen Populationen von KZ repräsentieren deren Entwicklungsstufen auf dem Weg zum reifen Spermium. Man kann die Spermatogenese in die folgenden drei Phasen unterteilen: Die Spermatozytogenese, die Meiose und die Spermiogenese. Während der Spermatozytogenese vermehren sich die Spermatogonien durch Mitose und bringen dabei A-, I-, B-Spermatogonien und schließlich primäre Spermatozyten hervor. Durch die Meiose, die zwei Reifeteilungen beinhaltet,

entstehen aus einem primären Spermatozyten vier reife Geschlechtszellen mit einem haploiden Chromosomensatz. Bei der folgenden Spermiogenese werden aus den frühen, runden Spermatisden, elongierte Spermatisden und letztlich Spermien mit der Fähigkeit zur Befruchtung (Bergmann 2006; Weinbauer et al. 2000) (s.Abb.1).



**Abbildung 1: Ablauf der Spermatogenese.**

**$2nxy$ : doppelter Chromosomensatz mit beiden Geschlechtschromosomen;  $nx$  bzw.  $ny$ : einfacher Chromosomensatz mit entweder einem x oder einem y-Chromosom (modifiziert nach Schnorr und Kressin 2006) .**

#### 1.1.1.1.1 Zeitliches Auftreten der verschiedenen KZ-Populationen bei der Maus

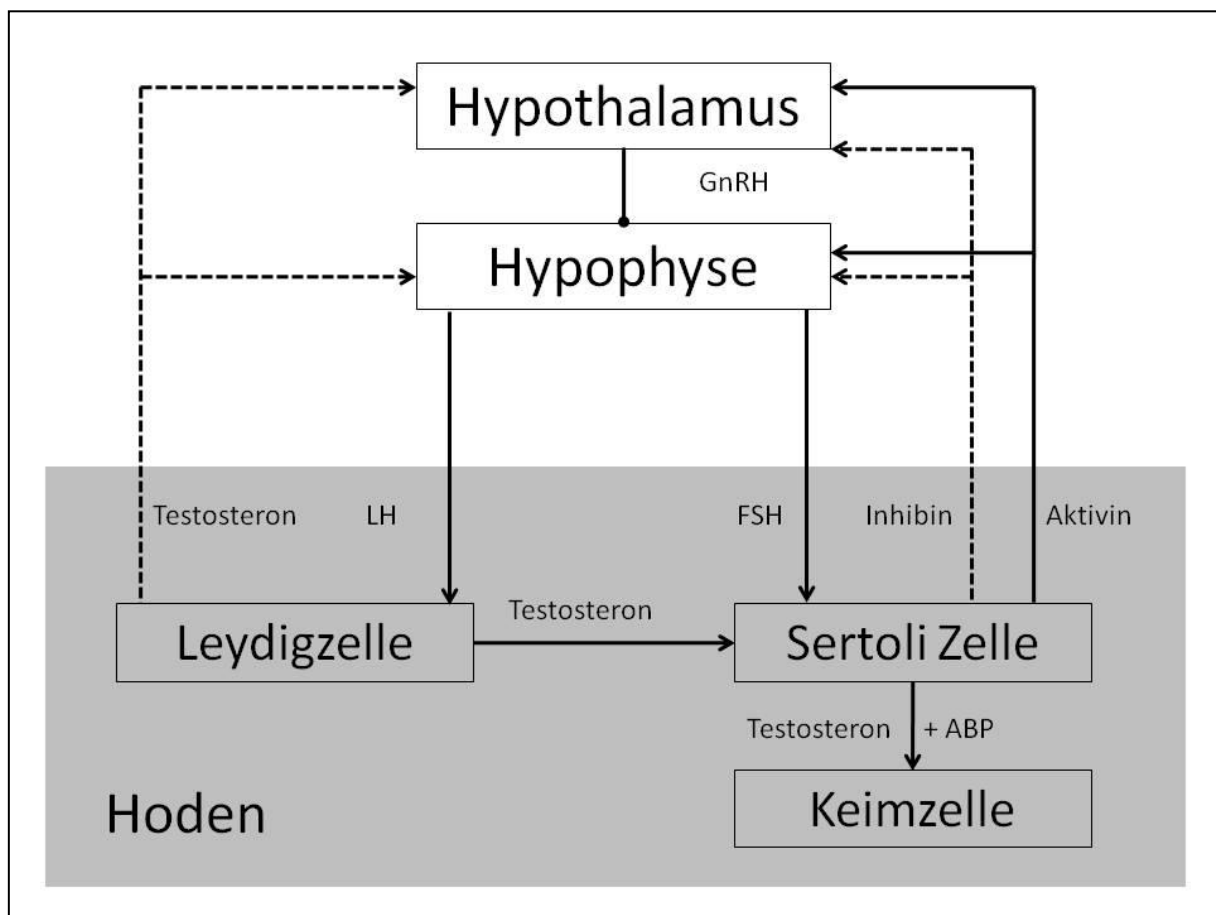
Die generelle Abfolge der KZ-Populationen ist bei allen männlichen Säugetieren vergleichbar. Unterschiede bestehen in ihrem zeitlichen Auftreten und dadurch bedingt im Eintritt der Geschlechtsreife (Busch und Zerbobin 1995; Schnorr und Kressin 2006). Nach der Geburt existieren in den Samenkanälchen der Maus nur SZ und Gonozyten. Letztere befinden sich zum Teil noch im Zentrum der Keimtubuli. An Tag sechs p.p. sind sie an die Basalmembran angeheftet und haben sich zu primitiven Typ A Spermatogonien entwickelt. Acht Tage p.p. sind vor allem Typ A und Typ B Spermatogonien in den Samenkanälchen zu finden. Bereits zehn Tage p.p. finden sich preleptotäne und leptotäne Stadien der meiotischen Prophase. Zygotäne Spermatozyten sind erstmals ab Tag 12 p.p. detektierbar, wobei frühe und späte pachytäne Stadien erst an Tag 14 bzw. 18 Tag p.p. erreicht werden. Sekundäre Spermatozyten und runde Spermatiden erscheinen an Tag 20 p.p., den Beginn der Spermiogenese anzeigend (Bellve et al. 1977). Während der Spermatogenese kommt es zum parallelen Auftreten von KZ in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung. Die jeweilige spezifisch sich wiederholende Zusammensetzung von bestimmten KZ-Populationen wird als Stadium des Keimepithelzyklus bezeichnet. Bei der Maus unterscheidet man 12 Stadien, wohingegen beim Menschen sechs Stadien unterschieden werden (Clermont 1963; Russel 1990).

#### 1.1.1.1.2 Stadien- und KZ- spezifische Genexpression

Während der KZ-Entwicklung zeigen ca. 30% des murinen Genoms eine signifikante Veränderung ihrer Transkription. Die stärksten Veränderungen der Genexpression treten in den ersten sechs Tagen nach der Geburt, beim Zeitpunkt der Initiierung der Meiose (~Tag 14 p.p.) und mit Auftritt der haploiden Gameten (~Tag 20 p.p.) auf. Viele Transkripte zeigen eine Anreicherung in einem oder sie sind sogar spezifisch für einen Zelltyp. Die meisten Zell-spezifischen Transkripte finden sich dabei in den runden Spermatiden, wobei auch Leydigzellen, SZ, peritubuläre Zellen und die übrigen KZ eigene, ihnen spezifische Gene, exprimieren (Shima et al. 2004).

#### 1.1.1.1.3 Regulation der KZ-Reifung

Die Steuerung der Spermatogenese geschieht einerseits durch Hormone und andererseits durch die Regulation der Expression verschiedener Gene. Die Regulation auf hormoneller Ebene geschieht durch ein System der gegenseitigen Induktion und Hemmung von Hypothalamus, Hypophyse, Testosteron produzierenden Leydigzellen und SZ (Comhaire und Mahmoud 2006) (s.Abb.2). Die SZ produzieren unter FSH-Wirkung das ABP, welches Testosteron bindet und unter anderem die Passage der Spermatozyten durch die SZ-SZ-



**Abbildung 2: Hormonelle Steuerung der Spermatogenese.**

**Gestrichelter Pfeil: negatives Feedback; durchgezogener Pfeil: positives Feedback (modifiziert nach Brehm und Steger 2005).**

Verbindungskomplexe ermöglicht. Die pulsatile Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus stimuliert die Freisetzung von FSH und LH aus dem Hypophysenvorderlappen. Über das Blut erreichen die beiden Hormone den Hoden. Hier führt LH zu einer Stimulation der Testosteronproduktion in den Leydigzellen, während FSH

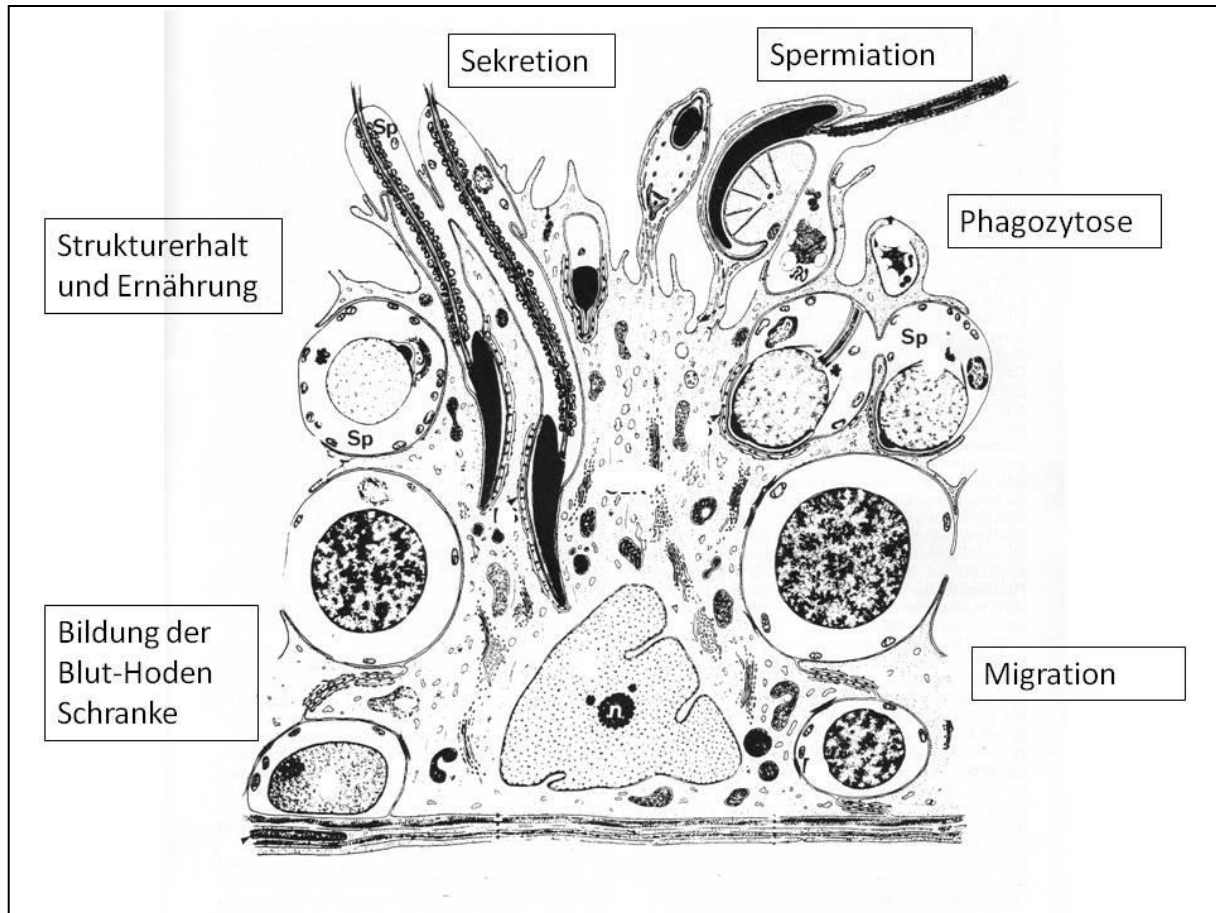


auf die SZ wirkt und hier z.B. zur Produktion von ABP, Inhibin und Aktivin führt. Die beiden letztgenannten wirken wiederum hemmend bzw. aktivierend auf Hypothalamus und Hypophyse. Testosteron selbst entwickelt ebenfalls eine Feedback-Hemmung (Brehm und Steger 2005). Die Regulation auf Genebene ist bis dato noch nicht vollständig erforscht. KO-Modelle und die gezielte Inaktivierung bestimmter Gene durch siRNAs sind leistungsfähige Werkzeuge, um einen besseren Einblick in diesen Bereich zu erhalten (Brehm et al. 2007; Cocquet et al. 2010).

#### 1.1.1.2 Die SZ, ihre Funktionen und die Blut-Hoden-Schranke

SZ haben in ihrem Leben überwiegend zwei funktionell getrennte Aufgaben. Während die fetalen bis neonatalen SZ ihr Betätigungsfeld in der Hodenbildung und der sexuellen Differenzierung haben, übernehmen sie ab der Pubertät ihre vorwiegend unterstützenden Funktionen in der Spermatogenese (Sharpe et al. 2003). Im Keimepithel besitzen adulte, differenzierte SZ verschiedene Aufgaben, die existenziell für eine funktionelle Spermatogenese sind. Sie sind Zielzellen für FSH und der Androgene, während sie selbst unter anderem die Proteine ABP und fetal auch Amh sezernieren. Die KZ ihrerseits besitzen keinen Androgenrezeptor, so dass die Wirkung von Testosteron durch die SZ, Leydigzellen und peritubuläre Zellen, die einen Androgenrezeptor besitzen, auf sie übertragen werden muss (Suarez-Quian et al. 1999). Mit ihren Zellausläufern bilden SZ untereinander Verbindungskomplexe aus, die unter anderem die anatomische Grundlage für die Blut-Hoden-Schranke darstellen. Diese dient als effiziente Diffusionsbarriere und trennt im Keimtubulus das basale Kompartiment, mit Spermatogonien und preleptotänen primären Spermatozyten vom adluminalen Kompartiment, welches lumenwärts gelegen ist, und die späteren, haploiden Stadien der KZ-Entwicklung enthält. Somit dient die Blut-Hoden-Schranke als Diffusionsbarriere vor einer möglichen, körpereigenen Autoimmunreaktion, da die späteren meiotischen Stadien der KZ-Entwicklung andere Oberflächenantigene exprimieren als frühere Stadien. Die SZ sind des Weiteren an der Migration der KZ vom basalen ins adluminale Kompartiment beteiligt. Durch die Sekretion von bestimmten Ionen, Laktat, Glutamat und anderen Komponenten der Tubulusflüssigkeit stellen sie ein besonderes Mikroklima her, sorgen für den Austausch von Metaboliten und die Ernährung der sich entwickelnden KZ. Ihre, die KZ eng umschließenden, Zytoplasmaausläufer sorgen dabei für den

Strukturerhalt des Keimepithels. Eine weitere Aufgabe besteht in der Phagozytose der Residualkörper der KZ und dem Entlassen reifer Spermien ins Tubuluslumen (Brehm und Steger 2005; Dym und Fawcett 1970; Jegou 1993; Pelletier und Byers 1992) (s.Abb.3).



**Abbildung 3: Adulte SZ mit ihren unterschiedlichen Funktionen und verschiedenen KZ-Populationen im Keimepithel.**

(SP=KZ; n=Nucleolus) (modifiziert nach Clermont 1993).

#### 1.1.1.2.1 Die SZ-Differenzierung

Einen wichtigen Zeitpunkt der Differenzierung der SZ stellt die Pubertät dar. Da es sich bei adulten, differenzierten SZ um postmitotische Zellen handelt, muss ihre endgültige Anzahl zuvor determiniert werden (Sharpe et al. 2003). Beim Menschen geschieht die Vermehrung in zwei Perioden. Die erste Periode der SZ-Vermehrung erfolgt fetal und neonatal, die zweite peripubertär. Beim Nager gehen die zwei Proliferationsperioden aufgrund des kurzen Abstandes zwischen Geburt und Pubertät ineinander über. Das Maximum der SZ-Proliferation liegt dabei zwei Tage vor der Geburt (Orth 1982; Sharpe et al. 2003). Die endgültige KZ-Zahl

wird durch die Anzahl der SZ bestimmt, wobei das Verhältnis SZ zu KZ speziesspezifisch determiniert ist (Orth et al. 1988). Der Maturationsprozess der SZ beinhaltet neben dem Verlust ihrer Teilungsfähigkeit, den Verlust von Differenzierungsmarkern (z.B. Amh), den Beginn der Expression bestimmter Differenzierungsmarker (z.B. des Androgenrezeptors), sowie die Formation der SZ-SZ-Verbindungskomplexe, die anatomische Grundlage der der Blut-Hoden Schranke (Bremner et al. 1994; Rajpert-De Meyts et al. 1999; Sharpe et al. 2003).

Bereits in den fetalen und postnatalen Keimsträngen stehen die Gonozyten bzw. Prä spermatogonien und SZ in enger Verbindung zueinander (Gondos und Berndston 1993). Es wird zudem vermutet, dass nicht nur differenzierte SZ existentiell für eine funktionierende KZ-Reifung sind, sondern auch im Gegenzug meiotische und postmeiotische KZ benötigt werden, um die SZ in ihrem maturen Zustand zu erhalten (Steger et al. 1999a). Die Anwesenheit von sich differenzierenden KZ zum Zeitpunkt der Pubertät ist ein möglicher Grund für die Induktion der terminalen Differenzierung der SZ, obwohl die Abwesenheit von KZ nicht notwendiger Weise zu einer fehlenden Differenzierung der SZ führt (Sharpe et al. 2003). Bewiesen jedoch ist, dass die Anwesenheit von meiotischen und postmeiotischen KZ tiefgreifende Effekte auf die Maturation der SZ hat (Boujrad et al. 1995).

#### 1.1.1.2.2 Regulation von Proliferation und Differenzierung der SZ

Die Regulationsmechanismen der SZ-Vermehrung und -Differenzierung lassen sich ebenfalls in hormonelle und parakrine Effekte auf der einen und genetische Mechanismen auf der anderen Seite einteilen (Sharpe et al. 2003). FSH ist vielfach als Stimulator der SZ-Proliferation im jungen Alter bestätigt worden, wobei auch LH eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Des weiteren gibt es Hinweise, dass Leydigzellen und auch andere Zellen des Hodens, wie peritubuläre Zellen und KZ, eine Rolle in diesem Prozess spielen (Gondos und Berndston 1993; Pelliniemi et al. 1993). Ein besonderes Augenmerk ist auf das von den Leydigzellen produzierte Testosteron zu legen, ohne welches die Produktion von Amh und somit auch die Maturation der SZ nicht beendet werden. Um seine Wirkung zu entfalten, muss Testosteron an den Androgenrezeptor binden, welcher im Keimepithel nur von maturen SZ exprimiert wird. Diese übertragen seine Wirkung wiederum auf die KZ (Rey et al. 2009; Suarez-Quian et al. 1999). Auf genetischer Ebene ist bekannt, dass unter anderem das Gen *Klf4* wichtig für die terminale Differenzierung der SZ ist und seine Deletion sich in einem

verzögerten Reifungsprozess äußert (Godmann et al. 2008). Auch Cx43 ist von Bedeutung für die Entwicklung und Proliferation der SZ, wie der SZ-spezifische KO dieses Gens zeigte (Brehm et al. 2007; Sridharan et al. 2007a; Sridharan et al. 2007b; Weider et al. 2011).

#### 1.1.1.2.3 Differenzierungsmarker der SZ

Adulte, terminal differenzierte SZ unterscheiden sich durch ihre Proteinexpression deutlich von ihren präpubertären Vorläufern. Dabei kann die Expression von verschiedenen Differenzierungsmarkern ein gutes Hilfsmittel bei der Interpretation unterschiedlicher Phänotypen sein (Sharpe et al. 2003).

Fetale und neonatale SZ exprimieren z.B. das Amh. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Geschlechtsdifferenzierung, da es für die Regression der Müllerschen Gänge beim männlichen Individuum verantwortlich ist (Josso et al. 1993). Mit der Pubertät, der funktionellen Expression des Androgenrezeptors und dem Eintritt der KZ in die Meiose wird die Amh-Expression weniger und verschwindet schließlich ganz. Dabei wird den beiden Ereignissen ein synergetischer Effekt in der Regression des Amh zugesprochen (Rajpert-De Meyts et al. 1999). In adulten Patienten mit normaler Spermatogenese ist kein Amh im Hoden mehr auffindbar, allerdings kann im Hoden von Patienten mit gestörter Spermatogenese oft noch eine Expression von Amh nachgewiesen werden (Steger et al. 1999a). Dies führt zu der Annahme, dass Patienten mit hohen Amh-Werten im Blut möglicherweise eine fehlende oder gestörte SZ-Differenzierung zeigen (Sharpe et al. 2003). Für die in dieser Arbeit verwendeten SCCx43KO-Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass die Synthese des Amh in adulten homozygoten KO-Tieren sistiert. Allerdings ist sein Verschwinden im Vergleich zu den WT-Tieren verzögert (Weider et al. 2011).

Die stadienspezifische Expression des Androgenrezeptors ist ein Charakteristikum maturer SZ (Bremner et al. 1994; Suarez-Quian et al. 1999). Auch wenn seine Expression schon kurz vor dem Erreichen des muren Stadiums beginnt, kann man ihn dennoch als guten Marker für einen differenzierten Zustand der SZ verwenden, da er im fetalen und frühen neonatalen Alter nicht exprimiert wird. Beim Menschen zeigt der Androgenrezeptor ab der Pubertät eine im Keimepithel auf die SZ beschränkte Expression (Sharpe et al. 2003; Williams et al. 2001). Bei der Maus beginnt dagegen die Expression des Androgenrezeptors in den SZ zwischen Tag

drei und fünf, bei der Ratte etwa am Tag fünf nach der Geburt, was somit zeitlich noch vor dem Ende der SZ-Proliferation liegt (Bremner et al. 1994; Denolet et al. 2006).

#### 1.1.1.2.4 Morphologische Veränderungen der SZ

SZ machen während der postnatalen Periode auch erhebliche funktionelle und strukturelle Veränderungen durch, welche für die Initiierung der Spermatogenese essentiell sind (Gondos und Berndston 1993). Zu den strukturellen Veränderungen gehört die Änderung der Zellgröße, der Zellform, des Zellkerns und des Zytoplasmas. Unmittelbar nach der Geburt zeichnen sich die SZ als kleine runde bis ovale Zellen aus, die auch als Prä-SZ bezeichnet werden. Mit der steigenden Anzahl von KZ während der Pubertät kommt es zu einem Wachstum der SZ; sie werden größer, verhältnismäßig höher und ihr Zytoplasma erstreckt sich schließlich bis zum Tubuluslumen. Des Weiteren kommt es zur Ausbildung von multiplen Zytoplasmafortsätzen zwischen den KZ. Zu den Veränderungen des Zellkerns zählen dessen Verlagerung von zentral nach basal, die Änderung seiner Form von oval zu dreieckig und die deutliche Dreiteilung des Nucleolus (Gondos und Berndston 1993). Bei der Maus wird diese Veränderung im Alter von ca. 2-3 Wochen sichtbar und geht mit dem Ende der SZ-Proliferation einher (Kluin et al. 1984; Vergouwen et al. 1991). Das Zytoplasma enthält mit der Pubertät dann große Mengen differenzierter Zellorganellen, wie z.B. glattes ER, Golgi Apparat und Mitochondrien. Mit der Pubertät kommt es des Weiteren zur Ausbildung der SZ-SZ-Verbindungskomplexe (Brehm und Steger 2005; Gondos und Berndston 1993). All diese morphologischen Kennzeichen von adulten SZ können zusammen mit den immunohistochemischen Markern genutzt werden, um den Entwicklungs- und Differenzierungszustand der SZ zu beurteilen. Zahlreiche Störungen der Spermatogenese sind mit einer Veränderung bzw. einer nicht dem Alter entsprechenden Morphologie der SZ assoziiert. So zeigen z.B. SZ in kryptorchen Hoden und SZ in hypoplastischen Keimtubuli, Ovotestes wahrer Hermaphroditen und die SZ vieler Patienten mit SCO-Syndrom präpubertäre, immature Charakteristika, in Form von rund-ovalen Zellkernen. Auch Hoden bzw. SZ von Patienten mit CIS zeigen morphologische Merkmale, die auf eine unvollständige Differenzierung oder Dedifferenzierung hinweisen (Brehm et al. 2002; Hoei-Hansen et al. 2003; Schulze und Holstein 1993).

### 1.1.2 Das interstitielle Gewebe

In diesem Kompartiment befinden sich vor allem Leydigzellen aber auch, ins lockere Bindegewebe eingebettet, Blut- und Lymphgefäße, Nerven und Zellen des Immunsystems. Die Leydigzellen produzieren und sezernieren Testosteron, das wichtigste männliche Geschlechtshormon (Weinbauer et al. 2000) (s.Abb.4).



**Abbildung 4: Adulte Maus mit normaler Spermatogenese.**

**\*= Keimtubulus mit SZ und verschiedenen KZ-Stadien; schwarze Pfeile: Interstitielles Gewebe mit Leydigzellen.**

### 1.2 Störungen der Spermatogenese

Die Ursachen für Spermatogenesestörungen sind vielfältig und können auch extratestikulären Ursprungs sein. Im Hoden selbst kann zwischen angeborenen (z.B. dem Klinefelter Syndrom) und erworbenen Ursachen (z.B. Entzündungsprozessen) unterschieden werden. Histologisch sind Hypospermatogenese, Arreste der Spermatogenese in den verschiedenen Stadien der KZ-Differenzierung, das SCO-Syndrom und Hodentumoren nachweisbar (Brehm und Steger 2005; Nieschlag 2000). Bei der Maus können Veränderungen der Spermatogenese vor allem

in Assoziation mit Mutationen im Genom gefunden werden, dazu gehören z.B. die hier untersuchten SCCx43KO-Mäuse, Stra8KO-Mäuse und Androgenrezeptor-defiziente Tiere (Anderson et al. 2008; Brehm et al. 2007; Denolet et al. 2006).

### 1.2.1 Hypospermatogenese

Bei diesem histologischen Phänotyp sind zwar alle Stadien der Spermatogenese im Hoden auffindbar, allerdings ist die Anzahl der KZ reduziert. Patienten können, während einige Samenkanälchen keinerlei Spermatogenese zeigen, benachbarte Kanäle mit intakter KZ-Entwicklung aufweisen. Diese histologischen Bilder werden häufig in Patienten mit nicht-obstruktiver Azoospermie gefunden und als bunte Atrophie bezeichnet (Brehm und Steger 2005; Sigg 1979).

Ein ähnliches Bild zeigt sich z.B. bei Mäusen mit einem KO des Taf7l-Gens. Zwar werden in diesen Tieren alle Stadien der Spermatogenese aufgefunden, jedoch ist die Morphologie der reifen Spermien verändert, was eine reduzierte Spermienzahl und gestörte Fertilität zur Folge hat (Cheng et al. 2007).

### 1.2.2 Spermatogeneseearreste

Die Spermatogenese kann an praktisch jedem Punkt unterbrochen werden. Der Arrest wird hierbei nach der Stufe bezeichnet, an der es zu einem Ausbleiben der Weiterentwicklung kommt. Es können folglich Arreste der Spermatogenese auf Stufe der Spermatogonien, der primären oder sekundären Spermatozyten oder der runden Spermatiden unterschieden werden. Die Ursache kann primär genetisch bedingt sein, aber auch sekundäre Faktoren, wie Strahlungsexposition, Chemotherapie oder generalisierte Erkrankungen können zu Störungen führen (Martin-du Pan und Campana 1993). Beispiele für genetische Alterationen beim Menschen, die Spermatogeneseearreste verursachen, sind Deletionen innerhalb des AZF b Locus auf dem Y-Chromosom, die zu einem Spermatozytenarrest führen und das Klinefelter Syndrom, wo neben Keimtubuli mit SCO-Syndrom und normaler Spermatogenese auch Spermatogeneseearreste vorkommen können (Elliott et al. 1997; Holstein et al. 1988).

Bei KO-Mäusen, die eine Deletion des Stra8-Gens aufweisen, kann ein Arrest der Spermatogenese auf Stufe der preleptotänen Spermatozyten aufgefunden werden (Anderson

et al. 2008). Im Gegensatz dazu sind Dazl-Gen defiziente Tiere in der Lage, die KZ bis zum leptotänen-/ zygotänen Stadium voranzutreiben, ohne jedoch elongierte Spermatiden zu entwickeln (Saunders et al. 2003).

### 1.2.3 SCO-Syndrom

Dieser Befund zeichnet sich durch das vollständige Fehlen jeglicher Art von KZ in den Samenkanälchen aus. Histologisch kann man eine fokale und eine generalisierte Form, in der der gesamte Hoden betroffen ist, unterscheiden. Ursache können hypogonadotroper Hypogonadismus, Östrogenbehandlung und Chemotherapie sein. Die SZ können dabei vier verschiedenen Gruppen zugeordnet werden: Normale, adulte SZ, immature SZ, SZ mit immaturem Kern und nahezu maturem Zytoplasma und involutierende SZ (Del Castillo et al. 1947; Nistal et al. 1990; Schulze und Holstein 1993). Bei Mäusen mit einer SZ-spezifischen Deletion des Dmrt1-Gens kommt es in den Samenkanälchen zunächst zu einem Arrest der Spermatogenese mit anschließendem Verlust der gesamten KZ-Population, die SZ zeigten eine gestörte Differenzierung (Kim et al. 2007a). Auch bei den hier untersuchten SCCx43KO-Mäusen kommen Tiere mit SCO-Syndrom vor. Die adulten SZ sind in diesem Fall jedoch „terminal“ differenziert (Weider et al. 2011).

## 1.3 Zellverbindungen und Blut-Hoden-Schranke

Zellen gehen miteinander verschiedene Zell-zu-Zell-Verbindungen ein, die sich in drei Gruppen aufteilen lassen:

(1) Undurchlässige Verschlusskontakte (Zonulae occludentes, „tight junctions“), die Zellen in einem Epithel zu einer undurchlässigen Barriere verknüpfen,  
(2) Ankerverbindungen (Maculae adherentes, „adherens junctions“, (Hemi-) Desmosomen) die Zellen und ihr Zytoskelett miteinander oder mit der extrazellulären Matrix verbinden und  
(3) kommunizierende Verbindungen (GJ, Nexus), die den direkten Übergang von Signalmolekülen und Metaboliten zwischen Nachbarzellen erlauben (Alberts et al. 2011). Alle drei Formen der Zell-Zell-Kontakte kommen im Hoden vor und bilden unter anderem die SZ-SZ-Verbindungskomplexe (Cheng und Mruk 2002; Pelletier und Byers 1992) (s.Abb.5). Während der Spermatogenese kommt es in der Blut-Hoden-Schranke zu Umstrukturierungsprozessen, um die Migration der preleptotänen und leptotänen



Spermatozyten vom basalen in das adluminal Kompartiment zu ermöglichen (Cheng und Mruk 2002). Interessanterweise sind diese Umstrukturierungsprozesse und das Auftreten der Cx43-Expression zeitlich korreliert, was eine Rolle dieser GJ- Kanäle in der Koordination des Prozesses vermuten lässt (Carette et al. 2010; Pelletier 1995).

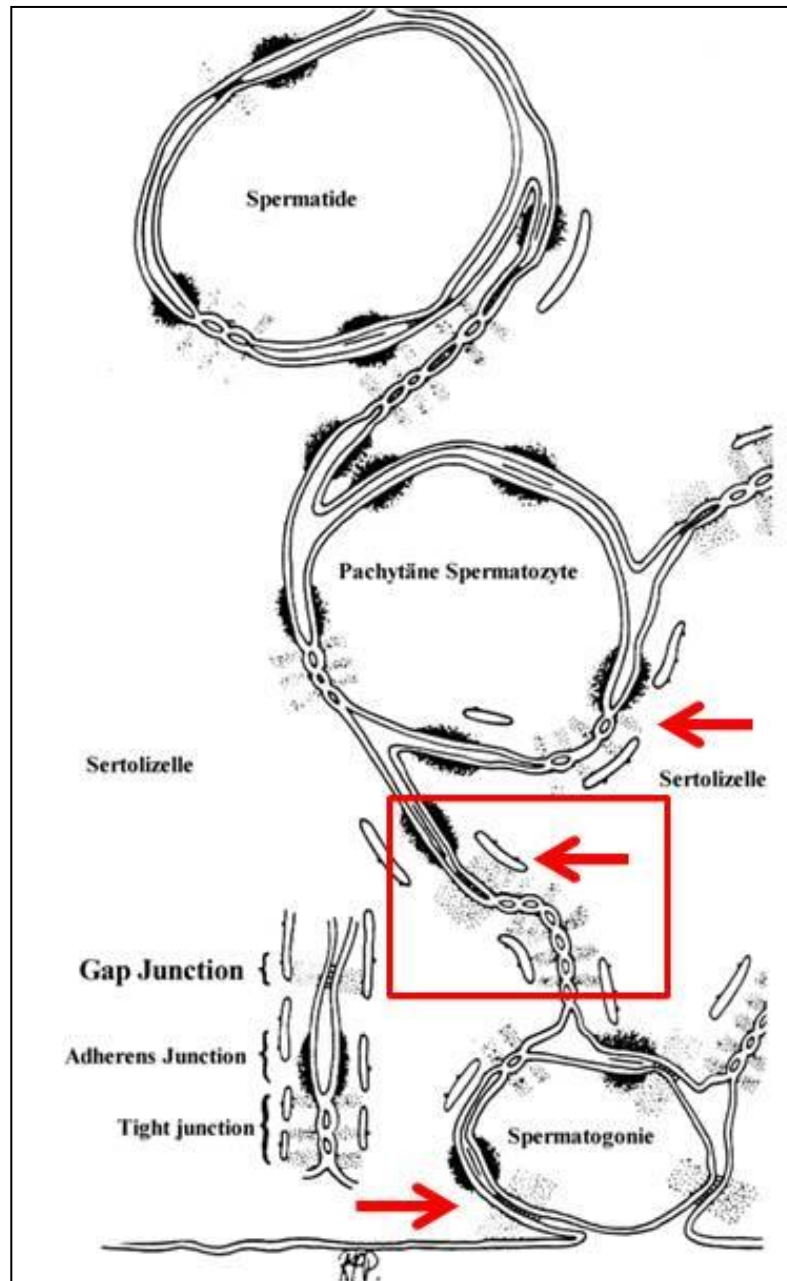


Abbildung 5: SZ-SZ-Verbindungskomplexe im Keimepithel.

Die roten Pfeile weisen auf die Stellen, an denen sich GJ befinden. Innerhalb des roten Rahmens liegt die Blut-Hoden-Schranke (modifiziert nach Pelletier und Byers 1992).

### 1.3.1 GJ

GJ kommen in praktisch allen Zellen mindestens zu einem Zeitpunkt ihrer Entwicklung vor, lediglich in wenigen enddifferenzierten Zellen, wie z.B. Skelettmuskelzellen, Erythrozyten und Spermien fehlen sie. Sie bilden Kanäle, die benachbarte Zellen miteinander verbinden und ihnen den Austausch von Signalmolekülen, Metaboliten und Ionen ermöglichen (Bruzzone et al. 1996). Eine direkte Kommunikation und Koordination der Zellen innerhalb eines Zellverbandes wird durch diesen Stofffluss gestattet (Kumar und Gilula 1996).

#### 1.3.1.1 Aufbau der GJ

Revel und Karnovsky belegten bereits 1967 den Zusammenhang des Auftretens von hexagonalen Membranstrukturen und der elektrischen Kopplung von Zellen (Revel und

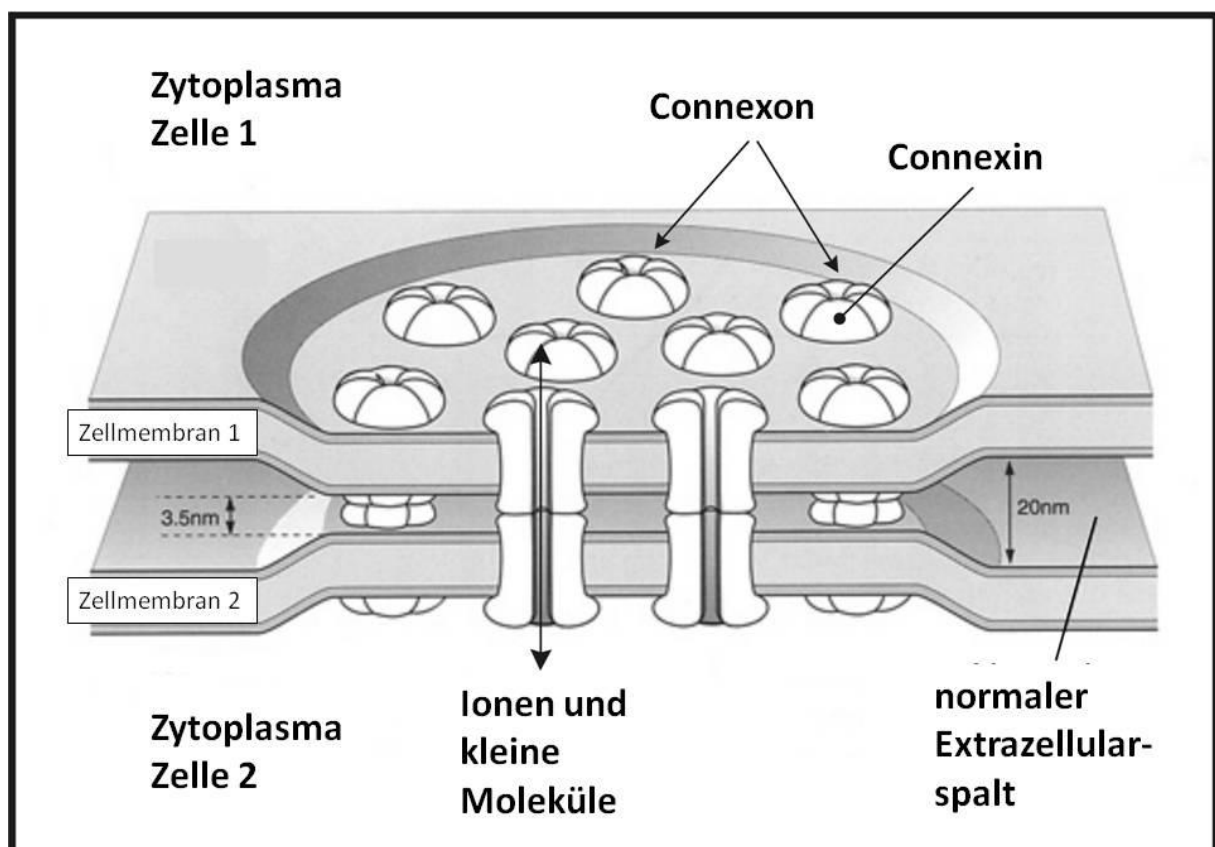


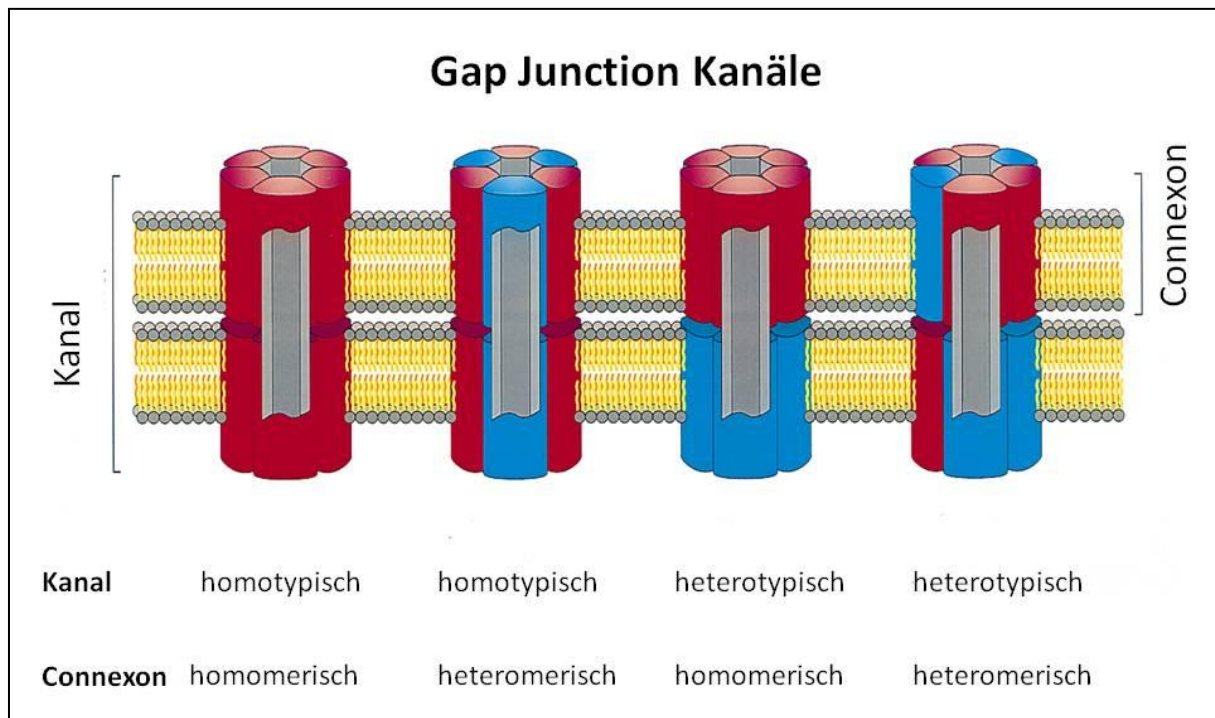
Abbildung 6: Aufbau eines GJ-Plaques.

GJ-Kanäle in den Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen (modifiziert nach Willecke et al. 2002).

Karnovsky 1967). An den Stellen der Zellmembran, wo sich diese Kanal-Strukturen befinden, ist der Interzellularspalt von normalerweise 20-30 nm auf 2-4 nm verringert (Caspar et al. 1977; Makowski et al. 1977). Der Aufbau der Kanäle konnte mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden: Jede der zwei benachbarten Zellen stellt einen Halbkanal (Connexon) zur Verfügung, welche gemeinsam einen vollständigen, für kleine Moleküle durchlässigen, GJ-Kanal bilden. Jedes Connexon wiederum besteht aus sechs Untereinheiten, den Cx. Die Cx stellen Transmembranproteine dar, die sich gemeinsam zu einer hydrophilen Pore zusammenschließen (Bennett et al. 1991; Bruzzone et al. 1996; Makowski et al. 1977). Durch die Ansammlung von tausenden von GJ-Kanälen entstehen die sogenannten GJ-Plaques (Kumar und Gilula 1996) (s.Abb.6). Der Fluss von Substanzen durch diese Kanäle, der eine koordinierte Kommunikation der Zellen eines Gewebes erlaubt, wird auch als interzelluläre Kommunikation, (GJ-intercellular communication (GJIC)) bezeichnet (de Feijter et al. 1996).

#### 1.3.1.2 Aufbau der Connexone

Die Connexone werden jeweils separat von den zwei Zellen, die durch den GJ-Kanal verbunden werden sollen, bereitgestellt. Die Connexone der beiden Zellen können dabei aus denselben (homomer) oder aus zwei unterschiedlichen Cx (heteromer) aufgebaut sein (Kumar und Gilula 1996). Ein Kanal wird als homotypisch bezeichnet, wenn die ihn bildenden Connexone identisch sind und als heterotypisch, wenn er aus zwei unterschiedlichen Connexonen zusammengesetzt ist. Es bilden aber nur bestimmte Connexone funktionelle heterotypische GJ-Kanäle miteinander aus. So bildet z.B. Cx31.1 nur homotypische Kanäle aus, während Cx43 z.B. mit Cx37, Cx45 und Cx46 heterotypische, funktionelle Kanäle erstellen kann (Bruzzone et al. 1996) (s.Abb.7). Heteromerische Connexone können z.B. aus Cx32 und Cx26 geformt werden (Bruzzone et al. 1996; Kumar und Gilula 1996).



**Abbildung 7: Connexone und ihre verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten.**

**GJ-Kanäle und Connexone können sowohl aus gleichartigen, als auch aus verschiedenen Cx-Untereinheiten zusammengesetzt sein (modifiziert nach Kumar und Gilula 1996).**

#### 1.3.1.3 Cx - Die Proteine der GJ

Die Cx sind Teil einer Multigenfamilie. Sie können gemeinsam in unterschiedlichen Geweben auftreten, zum Teil sogar gemeinsam in einem GJ-Plaque (Nicholson et al. 1987; Paul et al. 1991; Traub et al. 1989). Einige sind dabei gewebespezifisch, wie z.B. Cx33, das ausschließlich im Hoden von Nagern vorkommt, während andere (z.B. Cx43) in den unterschiedlichsten Zelltypen zu finden sind (Bruzzone et al. 1996; Fischer et al. 2005). Bis jetzt sind 21 verschiedene Mitglieder der Cx-Familie beim Menschen und 20 Mitglieder beim Nager gefunden worden (Söhl und Willecke 2004). Die Expression eines Cx ist vom Gewebe und dessen Differenzierungszustand abhängig. Dadurch ist es möglich, einige Cx als spezifische Differenzierungsmarker zu verwenden (Butterweck et al. 1994).

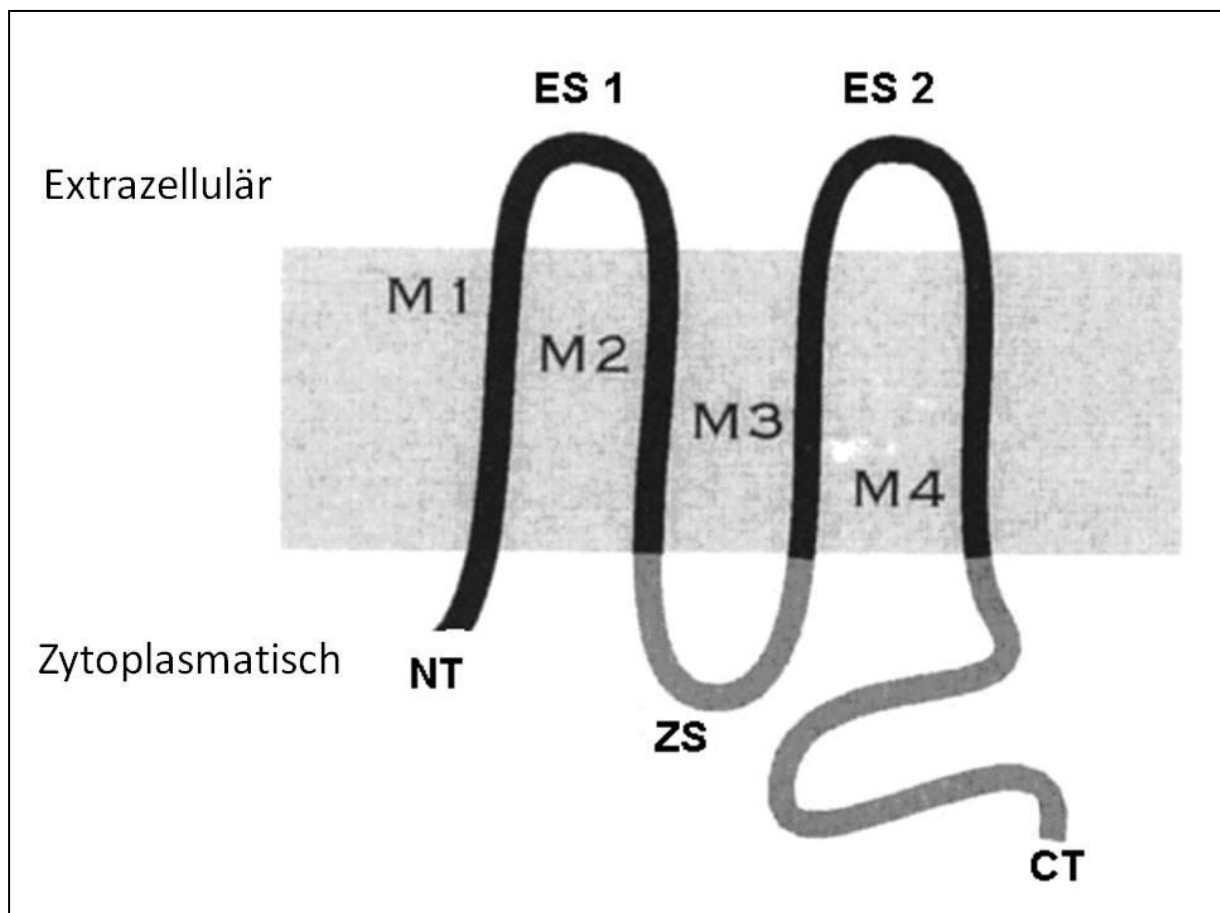
##### 1.3.1.3.1 Nomenklatur der Cx

Die Nomenklatur der Cx richtet sich nach jener, die von Beyer vorgeschlagen wurde: Der Name eines Cx setzt sich zusammen aus der Abkürzung Cx, optional der Abkürzung der Spezies (Mensch, Maus, Ratte, etc.), aus der es stammt und der aus der cDNA-Sequenz

abgeleiteten theoretischen Molekülmasse (Beyer et al. 1988). So wird für das murine Connexin43 die Abkürzung mCx43 verwendet (im Folgenden nur Cx43 genannt).

#### 1.3.1.3.2 Aufbau eines Cx

Der Aufbau eines einzelnen Cx-Monomers ist relativ einfach. Jede Untereinheit besteht aus vier membrandurchspannenden Domänen (M1-M4), einem C- terminalen (CT) und einem N-terminalen (NT) zytoplasmatischen Ende. Die Transmembrandomänen werden durch eine



**Abbildung 8: Aufbau eines Cx-Proteins.**

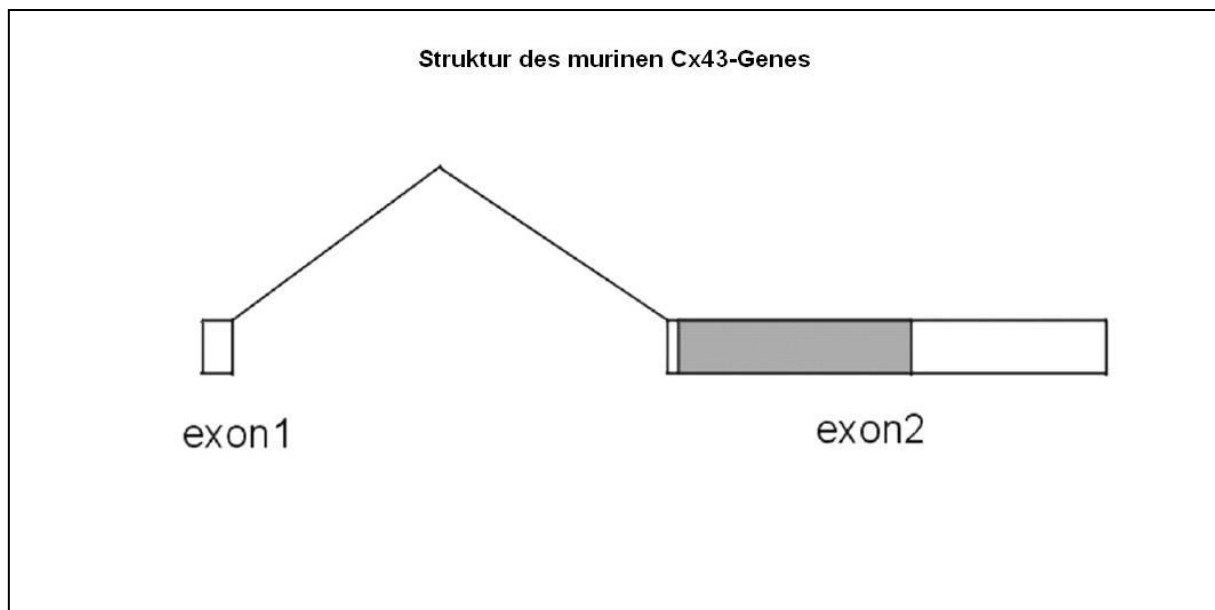
Schwarz sind die hoch konservierten Teile des Monomers dargestellt, während die grauen Anteile, variable Aminosäuresequenzen aufweisen. NT: N-terminales Ende; ES1, ES2: Extrazelluläre Schleifen 1 und 2; ZS: Zytoplasmatische Schleife; CT: C- terminales Ende; M1-4: Transmembrandomänen 1-4 (modifiziert nach White et al. 1995).

zytoplasmatische und zwei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Die Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen sind innerhalb der Cx-Familie hoch

konserviert, während die zytoplasmatische Schleife einzigartig in Länge und Sequenz ist (Haefliger et al. 1992; Kumar und Gilula 1996; Söhl und Willecke 2004) (s.Abb.8).

#### 1.3.1.3.3 Aufbau des Cx-Gens

Die Multigenfamilie der Cx hat unterschiedliche Mitglieder im menschlichen und im murinen Genom. So kommt z.B. Cx33 nur bei den Nagern vor, während Cx25 und Cx59 dem Menschen vorbehalten sind. Auch können bei den verschiedenen Spezies in demselben Gewebe unterschiedliche Cx exprimiert werden. Selbst die Größen der orthologen Cx-Transkripte divergieren zwischen den beiden Spezies (Söhl et al. 2003). Die generelle Struktur der Cx-Gene sieht wie folgt aus: Eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) auf Exon 1 ist separiert von der Cx-codierenden Sequenz und der darauf folgenden 3'-UTR auf Exon 2, wie in Abb.9 am Beispiel von Cx43 dargestellt. Das Gen für Cx43 wird auch als Gja1 bezeichnet.



**Abbildung 9: Struktur des Maus-Cx43-Gens.**

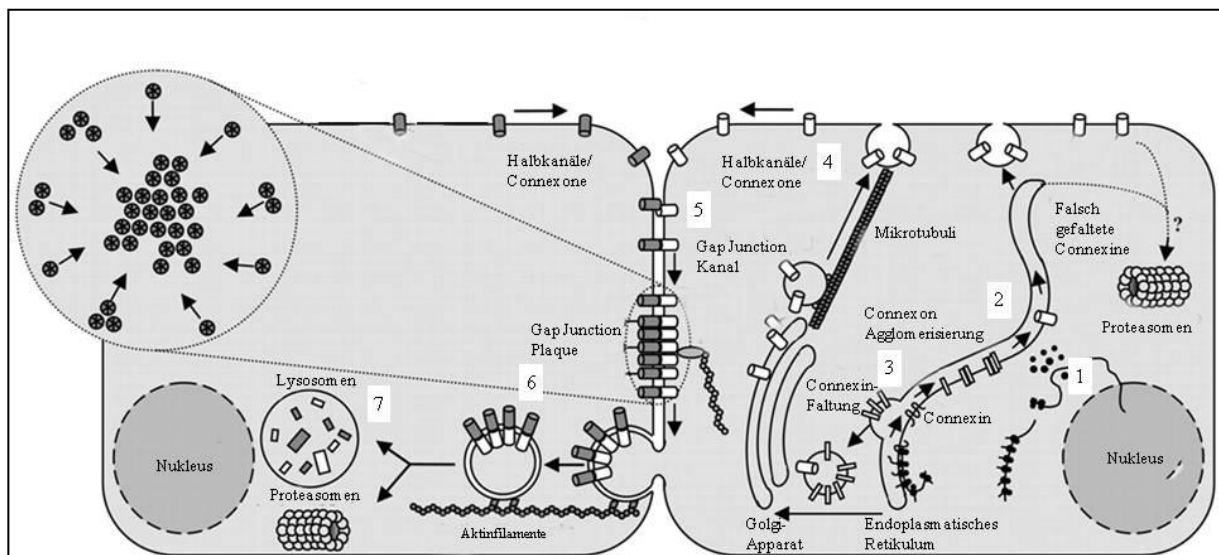
Das 5'-untranslatierte Exon 1 (5'-UTR) ist durch ein Intron mit variabler Länge von Exon 2 getrennt, welches die komplette kodierende Sequenz (grauer Bereich) und den folgenden 3'-UTR enthält (modifiziert nach Söhl und Willecke 2004).

#### 1.3.1.3.4 Cx43

Cx43 ist das GJ-Protein, welches in fast allen Geweben des Körpers exprimiert wird, und das entsprechend eine Vielzahl von biologischen Prozessen beeinflusst (Bruzzone et al. 1996). Besonders gut ist seine Funktion in den Kardiomyozyten und im Nervengewebe untersucht. Aber auch im Auge spielt dieses Cx eine wichtige Rolle. Cx43 ist unter anderem essentiell für die Reizleitung im Herzen und seine Deletion führt zum Tod der Tiere mit der Geburt (Gutstein et al. 2001; Reaume et al. 1995). Ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit dieses Cx im Körper ist die Tatsache, dass seine Expression bei Krankheiten wie Alzheimer und Multipler Sklerose verändert ist und dass Cx43-defiziente Mäuse neben einer beeinträchtigten Kammerwasserproduktion eine gestörte Spermatogenese haben (Brehm et al. 2007; Calera et al. 2006; Kirchhoff et al. 2000; Lock et al. 2002; Loring et al. 2001).

#### 1.3.2 Bildung von GJ-Kanälen

Die Bildung der Cx und von GJ-Kanälen läuft in verschiedenen Schritten ab, deren Regulationsmechanismen erst langsam verstanden werden (s.Abb.10). Zunächst wird die Cx-mRNA aus dem Zellkern transportiert und an den Ribosomen des rER translatiert (1). Das neu synthetisierte Cx wird dann gefaltet und lagert sich mit fünf weiteren zu einem Connexon (2)



**Abbildung 10: Bildung und Abbau von Cx und GJ-Kanälen.**

Beispiel für den Lebenszyklus eines Cx/ GJ (modifiziert nach Saez et al. 2003).

zusammen. Es ist beschrieben, dass die meisten Proteine im ER oligomerisieren, wobei nicht vollständige oder falsch gefaltete Proteine im ER festgehalten und degradiert werden (Hurtley und Helenius 1989). Ungeachtet dieser Tatsache scheint die Connexon-Bildung erst im Trans-Golgi-Netzwerk stattzufinden (3) (Musil und Goodenough 1993). Von diesem aus gelangen dann die meisten Connexone mit Hilfe von Vesikeln und Mikrotubuli zur Zellmembran, wo sie in diese eingebaut werden (4). Ausnahmen können Cx43 und Cx26 darstellen, die zum Teil direkt in die Membran eingebaut werden können. Dort liegen sie entweder einzeln vor oder bilden mit dem Connexon der angrenzenden Zelle einen funktionellen GJ-Kanal aus (5) (Bruzzone et al. 1996; Saez et al. 2003) (s.Abb.10).

### 1.3.3 Abbau von GJ-Kanälen

Die Lebensspanne von GJ-Kanälen ist eher kurz. So stellen Fallon und Goodenough eine mittlere Überlebenszeit von ca. fünf Stunden von Leber-GJ-Proteinen fest (Fallon und Goodenough 1981). Auch für die Cx43 und Cx45 Expression in Zellkultur konnten ähnliche Halbwertszeiten von 1,9 bis 2,9 Stunden detektiert werden (Darrow et al. 1995). Es konnte zudem gezeigt werden, dass intrazelluläre Strukturen, die mit einer Doppelmembran umschlossen sind, ganze, internalisierte, annuläre GJ darstellen (6) (Jordan et al. 2001) (s.Abb.10). Elektronenmikroskopische Studien weisen darauf hin, dass die Internalisierung ganzer Junctions durch eine Degradierung in Lysosomen oder Proteasomen komplettiert wird (7) (Jordan et al. 2001; Musil et al. 2000; Saez et al. 2003).

### 1.3.4 Regulation der GJIC

Die GJIC ist von der Cx-Zusammensetzung des jeweiligen Kanals abhängig. Verschiedene Kanäle zeigen hierbei eine unterschiedliche Selektivität (Valiunas et al. 2002). GJ und damit die GJIC können auf vielen verschiedenen Wegen reguliert werden. Cx können in demselben Zelltyp unterschiedlich reguliert und sogar dasselbe Cx kann in verschiedenen Zelltypen auf verschiedene Weise reguliert sein (Bruzzone et al. 1996). Die Bildung der GJ kann auf sechs Stufen zwischen DNA und Protein modifiziert werden: Durch Transkriptionskontrolle, durch Kontrolle der posttranskriptionalen Modifizierung, RNA-Bearbeitungs-Kontrolle, RNA-Transport- und Lokalisierungskontrolle, Translationskontrolle, Kontrolle der RNA-Degradierung und Protein-Aktivierungskontrolle. Von diesen Punkten ist die Kontrolle der



Transkription am bedeutendsten (Oyamada et al. 2005). Der interzelluläre Fluss von Stoffen/ Molekülen kann zusätzlich noch über den Öffnungszustand der Kanäle selbst und/ oder über die Degradierung der GJ-Kanäle beeinflusst werden.

#### 1.3.4.1 Regulation der Cx-Expression

##### 1.3.4.1.1 Transkriptionskontrolle

Bei den meisten Cx-Genen ist der proximale Promotor P1 ca. 300 bp strangaufwärts von dem Transkriptionsstartpunkt auf Exon 1 gelegen. In diesem Bereich finden sich sowohl Zelltyp-abhängige als auch Zelltyp-unabhängige (ubiquitäre) Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Oyamada et al. 2005). Zu den Zelltyp-unabhängigen Transkriptionsfaktoren, biologischen Substanzen und Signalwegen, die die Expression von Cx beeinflussen können, gehören die Sp1, Sp3, AP-1, cAMP, Retinoide, Wnt1 und der Ras-Raf-MAPK-Signalweg (Oyamada et al. 2005). Sp1 und Sp3 sind zwei Transkriptionsfaktoren, die den genannten Promotor 1 im Falle von Cx40 und Cx43 aktivieren können und deren Bindungsstellenzerstörung zu einer völligen Inaktivierung des Cx40-Promotors führt (Teunissen et al. 2002; Teunissen et al. 2003). Das AP-1 bindet eine konservierte Sequenz im Promotorbereich und induziert die Transkription des Gens. Ein bis mehrere AP-1-Bindungsregionen konnten für Cx43 bei den verschiedenen Spezies identifiziert und ihre Bedeutung in der Kopplung z.B. der Uterusmuskulatur bereits nachgewiesen werden (Geimonen et al. 1998; Piersanti und Lye 1995). Als ein weiterer Aktivator der Cx-Expression ist cAMP bekannt. Es wirkt über zwei Mechanismen: Die initiale schnelle Verlagerung von Cx43 aus dem Zytoplasma zur Zellmembran und spätere Stimulation der Cx43-Genexpression (Oyamada et al. 2005). Auch Retinoide sind bekanntermaßen Aktivatoren der GJIC und erhöhen transkriptionell die Cx43-Expression in normalen und in präneoplastischen Zellen (Rogers et al. 1990; Vine et al. 2005). Weiterhin konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Cx43 ein funktionelles Target des Wnt-Signalweges ist. So zeigen Zellen, die Wnt1 exprimieren eine erhöhte Cx43-mRNA-Expression, Cx43-Protein-Synthese und eine erhöhte elektrische und chemische Zellkopplung (van der Heyden et al. 1998). Auch der Ras-Raf-MAPK-Signalweg stellt eine Möglichkeit der transkriptionellen, positiven Beeinflussung der Cx-Expression dar (Carystinos et al. 2003).

Wie erwähnt gibt es auch Regulationsmechanismen, die die Cx-Expression zellspezifisch kontrollieren. Zu diesen gehören im Herzen die Gene Nkx2-5 und verschiedene T-Box Transkriptionsfaktoren, deren Bedeutung durch KO-Mausmodelle bewiesen wurde (Oyamada et al. 2005). Die Transkriptionsfaktoren GATA 4, 5 und 6 dagegen werden in zahlreichen Entoderm- und Mesoderm entspringenden Geweben exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. die Expression von Cx40 im Herzen durch GATA 4 gesteigert wird (Linhares et al. 2004).

Auch Hormone spielen in der Regulation der Cx-Gene eine Rolle. So steht die Expression von Cx43 im Myometrium unter der Kontrolle von Steroidhormonen. Cx43 wird durch Östrogene hoch und durch Progesteron herunterreguliert (Petrocelli und Lye 1993). Stock und Sies bewiesen einen stimulierenden Effekt von Thyroidhormonen auf die Cx43-mRNA in Leberzellen, während Mitchell et al. einen ähnlichen Effekt vom Parathormon auf den Cx43-Promotor zeigen konnten (Mitchell et al. 2001; Stock und Sies 2000).

#### 1.3.4.1.2 Epigenetische Mechanismen

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Cx-Expression stellen epigenetische Mechanismen dar. So konnte in zahlreichen Studien eine Inaktivierung von Cx-Promotoren durch Hypermethylierung ihrer DNA bewiesen werden (Hirai et al. 2003; Piechocki et al. 1999; Tan et al. 2002).

#### 1.3.4.1.3 Post-Transkriptionelle Regulation

Als interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site* (IRES)) wird in der Zellbiologie eine spezifische Faltung der mRNA bezeichnet, die ohne weitere, so genannte Initiationsfaktoren, die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt. Dadurch kann die Synthese von Proteinen unmittelbar gestartet werden. Im Gegensatz dazu steht die „Cap“-Struktur abhängige Translation („Cap“ entspricht einer 7-Methylguanosin-Struktur in reverser Orientierung), bei der die Bindung des Ribosoms an die zu translatierende RNA von der „Cap“-Region vermittelt wird (Ahne 2000). IRES-beinhaltende, zelluläre mRNAs werden in Zellen unter normalen, physiologischen Bedingungen translatiert, in denen die Cap-abhängige Translation supprimiert wird, aber die Translation für die in diesen Vorgang wichtigen Gene fortgeführt wird (z.B. in der Mitose). Da in einigen Cx-Genen IRES identifiziert worden sind,

kann hier wahrscheinlich ihre Proteinsynthese durch Cap-unabhängige-Translation reguliert werden (Hudder und Werner 2000; Schiavi et al. 1999).

Translationskontrolle durch „oberhalb“ gelegene Offene Leserahmen (*upstream open reading frames* (uORFs)) ist eine andere Möglichkeit der Translationskontrolle in Eukaryoten. Hierbei supprimiert die oberhalb auf der mRNA gelegene uORF-Sequenz das dahinter gelegene Gen (Oyamada et al. 2005). Nachgewiesen wurden solche uORF-Elemente bei der Maus für Cx31, Cx45, Cx46 und Cx47 (Anderson et al. 2005).

#### 1.3.4.2 Regulation des Öffnungszustandes von GJ-Kanälen

Der Öffnungszustand der GJ-Kanäle kann durch nicht-kovalente (d.h. elektrostatische, van der Waals Kräfte) und kovalente Bindungen (z.B. Phosphorylierungen) bestimmt werden. Die Öffnungswahrscheinlichkeit kann außerdem noch durch pharmakologische Agentien, extrazelluläre und intrazellulär Signale modifiziert werden (Bruzzzone et al. 1996). Wie auch bei konventionellen Ionenkanälen wird der Strömungsleitwert der Connexone durch den Unterschied im elektrischen Potential zwischen den Zellen beeinflusst. Hierbei hat die Cx-Zusammensetzung des Kanals einen großen Einfluss darauf, bei welchem Potenzialunterschied der Fluss über den Kanal zu- bzw. abnimmt (Bruzzzone et al. 1996). Zu den chemischen Faktoren, die die Öffnungswahrscheinlichkeit verändern, gehören unter anderem der pH-Wert und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Ripps et al. 2002; Rose und Loewenstein 1976). Es ist bekannt, dass es sich bei allen Cx, außer Cx26 um Phosphoproteine handelt; so konnte z.B. bei Cx32 eine Phosphorylierung über die cAMP-abhängige Protein Kinase, die Protein Kinase C und die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II nachgewiesen werden. Studien haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von Cx in einer Erhöhung des Stromleitwertes resultieren kann, jedoch divergiert die Wirkung der Kinasen in den verschiedenen Versuchssystemen und auf die verschiedenen Cx (Bruzzzone et al. 1996; Saez et al. 1986; Saez et al. 1990).

#### 1.3.5 GJ und Cx im Hoden

##### 1.3.5.1 GJ und Cx im Hoden mit normaler Spermatogenese

In vielen Spezies konnten schon testikuläre Cx nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den klassischen endokrinen und parakrinen Kontrollmechanismen spielen sie im Hoden bei der

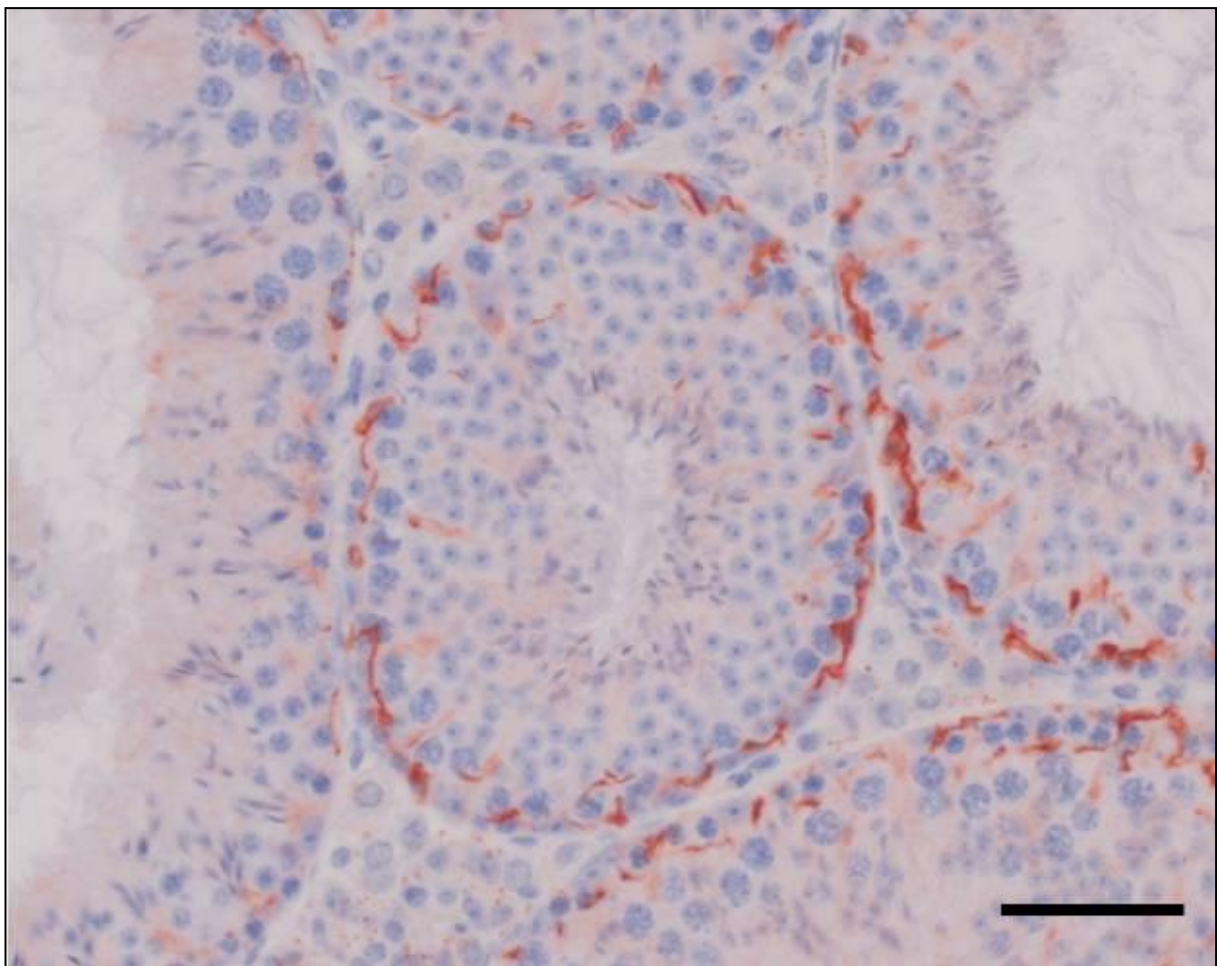
Initiierung und Koordination der Spermatogenese eine große Rolle (Griswold 1995; Pointis et al. 2010). So konnten z.B. im Hoden der erwachsenen Ratte bis jetzt 11 verschiedenen Cx-RNAs nachgewiesen werden, während im fetalen Mäusehoden 10 verschiedene Cx-Transkripte detektiert werden konnten (Pointis et al. 2005). Bei Störungen der Spermatogenese verringert sich die Anzahl der transkribierten Cx deutlich (Juneja 2003). Der über die GJ vermittelte Molekülfluss unterscheidet sich deutlich zwischen den verschiedenen Zellpopulationen in den Samenkanälchen, was eine Regulation der Kommunikation ermöglicht (Risley et al. 2002). Es ist wahrscheinlich, dass das Cx-Netzwerk aus verschiedenen Cx-basierenden GJ und die GJIC eine tragende Rolle bei der normalen Spermatogenese und der funktionellen Differenzierung von KZ und SZ spielt (Jegou 1993; Risley 2000; Risley et al. 2002).

#### 1.3.5.1.1 Räumliche Expression von GJ und verschiedenen Cx

Im Hoden werden Cx-Proteine von Leydigzellen, SZ, peritubulären Zellen und den verschiedenen Entwicklungsstufen der KZ bis zu den primären Spermatozyten exprimiert. Die Anzahl und Art der Cx unterscheidet sich jedoch erheblich bei den verschiedenen Zelltypen (Brehm und Steger 2005; Pointis et al. 2005). Innerhalb des Keimepithels sind die GJ überwiegend im Bereich der Blut-Hoden-Schranke und zwischen SZ und basalen KZ lokalisiert. Zwischen den KZ werden hingegen keine GJ ausgebildet (Pelletier und Byers 1992; Pointis et al. 2005). Cx43 ist das am stärksten exprimierte GJ-Protein im Hoden. Seine Verteilung reicht sowohl beim Nager als auch beim Menschen auf mRNA-Ebene von Leydigzellen, peritubulären Zellen und SZ bis zu den KZ. Beim Nager sind Cx-Proteine zwischen SZ und basal gelegenen KZ, sowie zwischen SZ und Spermatozyten aufzufinden (Batias et al. 2000; Defamie et al. 2003). Bei Maus und Ratte konnte in den SZ neben Cx43 auch Cx26, Cx32 und Cx33-Proteine nachgewiesen werden, während Cx31 und auch Cx50 exklusiv in den KZ exprimiert werden (Fischer et al. 2005; Mok et al. 1999; Risley et al. 1992; Risley 2000). In den Leydigzellen und auch den peritubulären Zellen hingegen wird bislang alleine Cx43 bei verschiedenen Spezies exprimiert (Pelletier 1995; Risley et al. 1992; Steger et al. 1999b). Beim Menschen ist die Lokalisation des Cx43-Proteins ebenfalls zwischen den Leydigzellen zu finden und auch in den Samenkanälchen konnte eine deutliche Immunreaktion zwischen den SZ und zwischen SZ und KZ detektiert werden (Brehm et al. 2002; Steger et al. 1999b).

#### 1.3.5.1.2 Zeitliche Expression von GJ und Cx43

Die zeitliche Cx-Expression ist von dem Entwicklungsstand des Individuums (fetal, präpubertär, adult), dem Cx-Typ, der Spezies und dem Stadium des Keimepithels abhängig. So konnten GJ-Kanäle sowohl in adulten, als auch in präpubertären Tieren gefunden werden (Batias et al. 2000; Bravo-Moreno et al. 2001). Cx43-Transkripte wurden bei der Maus bereits im fetalen Hoden gefunden (Perez-Armendariz et al. 2001). In der Ratte hingegen beginnt die Expression erst an Tag fünf nach der Geburt (Tan et al. 1996). Die Transkription ist im adulten Tier stärker, dabei kann eine Zunahme der Cx43-Expression während der ersten Spermatogenesewelle innerhalb der Keimtubuli beobachtet werden (O'Shaughnessy et al. 2003; Pointis et al. 2005).



**Abbildung 11: Repräsentative Cx43-IHC einer adulten Maus.**

**Ein deutliches Signal im Bereich der Blut-Hoden-Schranke und zwischen den interstitiellen Leydigzellen ist erkennbar. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20µm.**

Microarray-Analysen haben gezeigt, dass sowohl die Cx26 als auch die Cx40-Expression in der Entwicklung von der primitiven Typ A zur Typ B Spermatogonie hochreguliert wird und Cx26 danach, während der Entwicklung zur preleptotänen Spermatozyte, wieder herunterreguliert wird (Yu et al. 2003). Zusätzlich zu Veränderungen in der Expressionsstärke der verschiedenen Cx, verändert sich auch ihre Lokalisation während der postnatalen Entwicklung. Das Signal von Cx43 „wandert“ dabei bei Maus und Ratte vom adluminalen Kompartiment des Keimtubulus nach basal, in den Bereich, in dem später die Blut-Hoden-Schranke lokalisiert ist (Bravo-Moreno et al. 2001; Tan et al. 1996) (s.Abb.11). Im Gegensatz zu Ratte und Maus wird beim Menschen Cx43 wahrscheinlich erstmals mit der Pubertät im Keimtubulus exprimiert (Steger et al. 1999b).

Beim erwachsenen Tier und beim Mann können zusätzlich noch Keimepithelzyklus-abhängige Veränderungen in der Expression von Cx43 detektiert werden. Bei Maus und Ratte ist die vermehrte Expression in den Samenkanälchen im Stadium VII erkennbar (Batias et al. 2000; Tan et al. 1996), während beim Menschen eine Verminderung oder sogar ein Fehlen der Expression von Cx43 zwischen den SZ im Stadium II und III des Keimepithelzyklus beobachtet werden können. Diese Veränderung der Expression bezeichnet den Zeitpunkt, an dem es zu einem Übertritt der primären Spermatozyten in den adluminalen Bereich durch die geöffnete Blut-Hoden-Schranke kommt (Steger et al. 1999b).

### 1.3.6 GJ, Cx und ihre Funktion(en) im Hoden

Es gibt deutliche Hinweise dafür, dass GJ in verschiedenen testikulären Funktionen eine Rolle spielen. Viele Erkenntnisse konnten durch die Generierung von unterschiedlichen KO-Mäusen gewonnen werden. Im Interstitium wird Cx43 der Leydigzellen eine Bedeutung in der Testosteronproduktion und -sekretion zugeschrieben, wobei neuere Studien die Vermutung nahe legen, dass es nicht essentiell für die Testosteronproduktion ist (Kahiri et al. 2006; Perez-Armendariz et al. 2001). Während der fetalen Entwicklung scheint ein Einfluss auf die Migration und das Targeting der KZ in die Gonaden wahrscheinlich. Diese Vermutung kommt einerseits daher, dass bekanntermaßen Cx43 einen Einfluss auf die Migration anderer Zelltypen besitzt und andererseits durch die Tatsache, dass Cx43-defiziente Gonaden eine wesentlich geringere Anzahl von KZ aufweisen (Francis und Lo 2006; Juneja et al. 1999; Wei et al. 2004; Xu et al. 2001). Nach der Geburt wird Cx43 eine Rolle in der Kontrolle der SZ-

Differenzierung der ersten Lebenswochen zugesprochen (St-Pierre et al. 2003). Schließlich kann in der Pubertät ein Zusammenhang zwischen dem Auftauchen dieses GJ-Proteins, der KZ-Differenzierung und der Modulation der SZ-Barriere hergestellt werden (Pelletier 1995). Weiterhin scheint die Synchronisation, Proliferation und Differenzierung der KZ über das GJ-Netzwerk vermittelt zu werden (Decrouy et al. 2004).

#### 1.3.6.1 GJ und Cx im Hoden und Störungen der Spermatogenese

Unterschiedliche Studien haben sich mit dem Zusammenhang einer gestörten Spermatogenese und der Expression von GJ-Kanälen befasst. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit SCO-Syndrom oder einem Arrest der Spermatogenese auf Niveau der Spermatogonien einen vollständigen Verlust der Cx43-Expression zeigen, während im interstitiellen Kompartiment das Protein detektierbar bleibt (Defamie et al. 2003; Steger et al. 1999b). Auch mit CIS infiltrierte Keimtubuli und Seminome lassen eine Cx43-Expression missen (Brehm et al. 2002). Arreste der Spermatogenese auf Niveau der Spermatozyten und runden Spermatiden führen zu einer starken Verringerung von GJ-Kanälen (Schleiermacher 1980). Auch bei anderen Spezies, wie z.B. Maus, Ratte und Hund konnten Störungen der Spermatogenese und Hodentumore mit einer veränderten Cx-Expression in Verbindung gebracht werden, was die Bedeutung dieser Proteine für den ungestörten Ablauf der Spermatogenese deutlich macht (Brehm et al. 2007; Rüttinger et al. 2008).

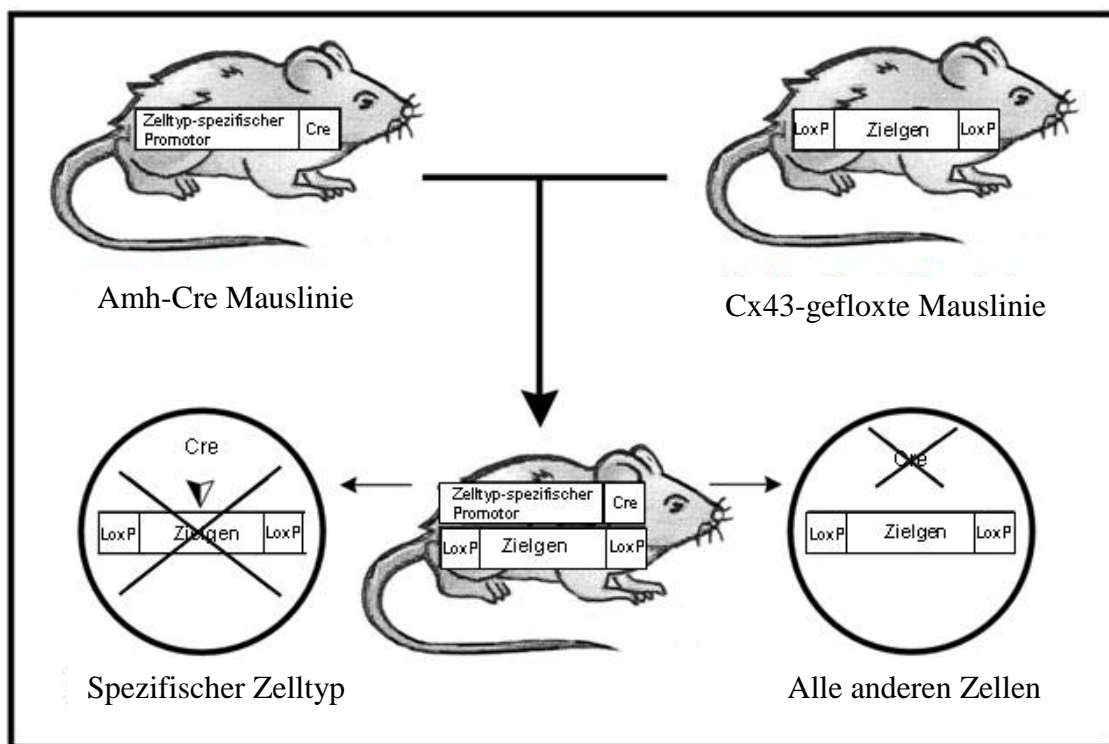
#### 1.3.6.2 Regulation der GJIC und der Cx-Expression in den SZ

Wie allgemein für Cx gültig, kann ihre Expression und damit die GJIC auf der Stufe des Genoms (DNA), durch Modifikationen der Transkription, durch Beeinflussung der mRNA, der Translation und des Proteins selbst erfolgen. Unter physiologischen Bedingungen beeinflussen die Initiierung der Spermatogenese und auch die verschiedenen KZ-Populationen die Cx-Expression der SZ in Mensch, Maus und Ratte (Batias et al. 2000; Bravo-Moreno et al. 2001; Steger et al. 1999b; Tan et al. 1996). Unter den hormonellen Faktoren und Stoffen, die auf die GJIC einen Einfluss nehmen sind FSH, Schilddrüsenhormone genauso wie Testosteron, Östrogene und Retinol zu nennen (Batias et al. 1999; Herve et al. 1996; Pluciennik et al. 1994; Pluciennik et al. 1996; St-Pierre et al. 2003). Diesen regulären Einflüssen stehen toxische Substanzen gegenüber, die die GJIC verhindern oder zumindest

stören können. Umweltgifte, wie z.B. Lindan und DDT führen durch eine Verringerung der Anzahl der Cx, Förderung der intrazellulären Lokalisation von Cx43, Phosphorylierung und Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase zu Störungen der GJIC (Aravindakshan und Cyr 2005; Defamie et al. 2001; Fiorini et al. 2004; Mograbi et al. 2003).

#### 1.4 KO und Knockin(KI) Modelle

Durch die Möglichkeit bestimmte Gene aus dem Mäusegenom zu entfernen oder in dieses einzuschleusen (KI), können wichtige Erkenntnisse über ihre Funktion und Bedeutung gewonnen werden. Die so genannten KO-Mäuse ermöglichen am lebenden Individuum die Funktionsanalyse einzelner Gene, indem über den Funktionsverlust auf die eigentliche Funktion des Gens rückgeschlossen wird. Oftmals dienen die Tiere dabei als Modellorganismen für menschliche Erkrankungen. Die Einschleusung von bestimmten Genen in das Genom, meist an Stelle eines zuvor ausgeknockten Gens ermöglicht deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede genauer zu studieren. Generell kann zwischen einem



**Abbildung 12: Kreuzungsschema einer konditionellen KO-Mauslinie.**

Beispiel der Zucht des SZ-spezifischen Cx43KO (Cre=causes recombination-Rekombinase, LoxP =locus of X-ing over) (modifiziert nach Brehm und Steger 2005).



konventionellen KO, in dem das Gen in allen Zellen des Körpers fehlt, und einem konditionellen KO, in dem das Gen z.B. nur in bestimmten Zellpopulationen entfernt wurde, unterschieden werden. Letzteres geschieht z.B. indem eine Mauslinie, in der das zu entfernende Gen mit LoxP (locus of X-ing over) -Elementen markiert ist, mit einer Mauslinie gekreuzt wird, die das Gen der Cre (causes recombination)-Rekombinase, hinter einen bestimmten, zellspezifischen Promotor geschaltet, exprimiert (s.Abb.12). Da die Rekombinase das betroffene Gen nur in dem Zelltyp „ausschneidet“ in dem der Promotor abgelesen wird, können auch Deletionen untersucht werden, die im konventionellen KO letal sind (Nagy 2000). Die Insertion von einem stillen LacZ-Gen hinter das codierende Exon, welches für das Protein  $\beta$ -Galaktosidase kodiert und nur bei erfolgreicher Deletion des jeweiligen Gens transkribiert wird, ermöglicht es zusätzlich den erfolgreichen KO durch eine IHC mit Farbreaktion zu verifizieren.

#### 1.4.1 Cx-KO und KI-Modelle

##### 1.4.1.1 Auswirkungen von CxKO auf die Embryonalentwicklung

Um die Rolle und Verteilung bestimmter Cx während der fetalen Entwicklung, bis hin zum erwachsenen Individuum zu erforschen, wurden unterschiedlichste CxKO- und KI-Modelle erstellt (Willecke et al. 2002). Der erste beschriebene CxKO betraf Cx43. Durch eine veränderte Morphologie des Truncus pulmonalis und einen gestörten Ausfluss des Blutes aus dem rechten Ventrikel, sterben homozygote Cx43KO-Mäuse direkt nach der Geburt durch eine mangelnde Sauerstoffversorgung (Reaume et al. 1995). Es gibt Hinweise darauf, dass auch Veränderungen in der Migration der Neuralleistenzellen bei diesem KO einen Beitrag zur Herzmissbildung leisten (Lo et al. 1999). Doppelmutanten für Cx40 und Cx43 (Cx40<sup>+/-</sup>/Cx43<sup>+/-</sup> und Cx40<sup>-/-</sup>/Cx43<sup>+/-</sup>) zeigen eine Reihe von Herzmissbildungen und sind trotz einer hohen embryonalen und perinatalen Sterblichkeit lebensfähig. Ein Großteil der Mutanten zeigt eine Herzhypertrophie in Kombination mit einer gemeinsamen atrioventrikulären Verbindung oder einem Ventrikelseptumdefekt. Auch die Reizleitung ist in Kammer und Vorhof gestört, wobei ein additiver Effekt bei doppelt heterozygoten (Cx40<sup>+/-</sup>/Cx43<sup>+/-</sup>) Tieren in der Kammer- aber nicht in der Vorhofreizleitung zu sehen ist (Kirchhoff et al. 2000). Doppelmutanten von Cx43 und 32 (Cx43<sup>-/-</sup>/Cx32<sup>Y/-</sup> und Cx43<sup>-/-</sup>/Cx32<sup>-/-</sup>) zeigten keinen Unterschied in der Embryonalentwicklung zu Cx43-Mutanten was durch ihre gemeinsame Expression in den veränderten Geweben erklärbar ist (Houghton et al. 1999). Cx45 defiziente

Mäuse sterben bereits embryonal mit Veränderungen in den Endokardkissen der Herzanlage (Kumai et al. 2000) und einer gestörten Gefäßbildung in Dottersack, Plazenta und Embryo selbst (Kruger et al. 2000). Auch die Entfernung des Cx26-Gens führt durch eine gestörte Verbindung zwischen maternaler und fetaler Plazenta bereits in der Embryonalperiode zum Tod (Gabriel et al. 1998). Bei Cx31 defizienten Mäusen konnten Würfe von weniger als der Hälfte der zu erwartenden Größe beobachtet werden. Desweiteren zeigten die Cx31 defizienten Zellpopulationen eine Hochregulierung von Cx43. Dies lässt vermuten, dass Cx43 in etwa der Hälfte der Embryos in der Lage ist, den Verlust von Cx31 zu kompensieren (Plum et al. 2001). Obwohl sehr viele Cx bereits während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, führt nur die Deletion von einem geringen Teil von ihnen zu Störungen in der Embryogenese. Dies ist möglicherweise, wie bei Cx31, durch eine Kompensation durch andere Cx zu erklären (Willecke et al. 2002). Im Gegensatz dazu zeigt der frühe, postnatale Tod der Cx43-defizienten Tiere, dass gerade dieses Cx eine essentielle Bedeutung in der Entwicklung bereits im Embryonalalter hat (Reaume et al. 1995).

#### 1.4.2 CxKO-Mäuse und Spermatogenese

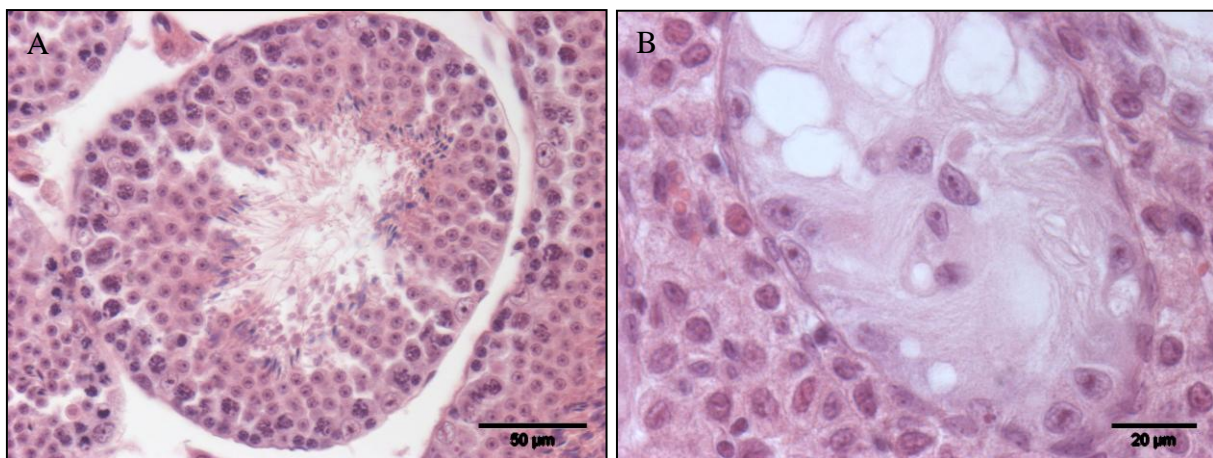
Der Cx43KO führt zum Tod direkt nach der Geburt, was eine Untersuchung der funktionellen Spermatogenese verhindert (Reaume et al. 1995). Trotzdem konnte bereits fetal/ embryonal ein starker KZ-Verlust beobachtet werden, was die essentielle Rolle von Cx43 vermittelten Zellkopplung in der KZ-Entwicklung deutlich macht (Juneja et al. 1999). Francis und Lo konnten nachweisen, dass bereits primordiale KZ über eine Zellkopplung verfügen und dass der KZ-Verlust in den Cx43-defizienten Embryos wahrscheinlich durch eine erhöhte Apoptose bedingt ist. Dagegen konnten sie keine signifikante Veränderung in der Migration der primordialen KZ in die Keimleisten feststellen (Francis und Lo 2006). Der Vergleich der Cx-Expression in fetalen Hoden von Cx43KO-Mäusen mit Tieren, welchen Cx43 exprimieren, zeigte, dass durch den Verlust dieses Gens vier weitere Cx nicht mehr exprimiert werden (Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx46). Es ist möglich, dass ein Teil der morphologischen und funktionellen Veränderungen der Cx43KO-Tiere durch diesen zusätzlichen Cx-Verlust (mit)verursacht wird (Juneja 2003). Die Transplantation der Hoden von Cx43-defizienten Mäusen unter die Nierenkapsel von adulten WT-Mäusen konnte keine Proliferation und Differenzierung der KZ bewirken, wobei die Hormonproduktion und die Kopplung der Leydigzellen unbeeinträchtigt blieb (Roscoe et al. 2001). Der genaue Mechanismus, der zur

Sterilität dieser KO-Mäuse führte, ist dabei bis heute unbekannt (Pointis et al. 2005). Auch die Insertion von Cx40 oder Cx32 als Ersatz für Cx43 waren nicht in der Lage, eine funktionelle Spermatogenese herzustellen. So waren Cx43KOCx40KI und Cx43KOCx32KI trotz Veränderungen des Herzens lebensfähig aber infertil. In beiden Mäusestämmen ist die Anzahl der KZ in den Samenkanälchen deutlich reduziert oder es liegt ein SCO vor und keine weiter entwickelten Stadien der KZ-Entwicklung sind auffindbar (Plum et al. 2000). Cx43KOCx26KI Tiere sind ebenfalls lebensfähig trotz vorhandener Herzveränderungen, jedoch zeigen auch sie eine gestörte Spermatogenese. Die KZ sind dabei nicht in der Lage, sich über das Stadium der primären Spermatozyten hinaus zu entwickeln (Winterhager et al. 2007). Diese Beispiele zeigen, dass bestimmte Cx neben gemeinsamen Funktionen, in denen sie durch andere Cx ersetzt werden können, auch Aufgaben innehaben, in denen sie unentbehrlich sind.

#### 1.4.3 SZ-spezifischer KO von Cx43(SCCx43KO)

Unabhängig voneinander wurden von zwei Arbeitsgruppen Mäuse mit einem SCCx43KO generiert. Es wurde dazu das CreLoxP-Rekombinasesystem zur Hilfe genommen. Um den konditionellen KO von Cx43 selektiv in den SZ des Hodens zu erhalten, wurden Mäuse, deren Cx43-Gen mit LoxP markiert ist (Cx43flox), mit Mäusen gekreuzt, denen das Gen für die Cre-Rekombinase dem Amh-Promoter nachgeschaltet ist (Amh-Cre) (Lecureuil et al. 2002) (s.Abb.12). Die Rekombinase katalysiert selektiv die ortsspezifische Rekombination zwischen DNA-Zielsequenzen, sogenannten LoxP-Elementen und entfernt das zwischen den Elementen gelegene Gen aus dem Genom der Zelle (Theis et al. 2000). Da der Amh-Promotor lediglich in den SZ des Hodens abgelesen wird, wird auch nur hier die Cre-Rekombinase transkribiert und translatiert, und auch nur hier das Cx43-Gen ausgeschnitten. Es zeigte sich, dass die Tiere im Gegensatz zu den generell Cx43-defizienten Mäusen lebensfähig sind, jedoch bei den homozygot ausgeknockten männlichen Tieren keine funktionierende Spermatogenese mehr stattfindet (Brehm et al. 2007; Sridharan et al. 2007b). Das Körpergewicht und die Organfunktionen von adulten WT-Mäusen unterscheiden sich nicht von dem der genveränderten Tiere. Anders zeigt es sich beim Hoden, dessen Gewicht bei Cx43-defizienten Tieren um 75% gegenüber dem Hodengewicht von adulten WT-Mäusen reduziert ist. Obwohl auch bei den homozygot ausgeknockten Tieren eine normale Entwicklung des Geschlechtsapparates und des Hodenabstiegs (Descensus testis) stattfindet,

sind in der histologischen Untersuchung des Hodens einige gravierende Veränderungen erkennbar. In den Hodenschnitten der adulten Mäuse findet sich in 95% der Tubuli ein Arrest der Spermatogenese auf Stufe der Spermatogonien oder ein SCO-Syndrom. Die übrigen 5% der Samenkanälchen zeigen eine „normale Spermatogenese“, wobei aber keine Spermien im Nebenhoden gefunden werden konnten. Zusätzlich zu der Veränderung der KZ kann in den KO-Tieren eine signifikant höhere Anzahl von SZ je Tubulusquerschnitt detektiert werden, oftmals kombiniert mit einem vakuolig verändertem Zytoplasma dieser Zellpopulation, intratubulären Zellklustern und einer Leydigzellhyperplasie (Brehm et al. 2007; Sridharan et al. 2007a; Sridharan et al. 2007b) (s.Abb.13).



**Abbildung 13: Phänotyp von einer adulten WT-Maus (A) und einer adulten SCCx43KO-Maus (B).**  
Während in der WT-Maus alle KZ-Stadien erkennbar sind, sind bei der SCCx43KO-Maus hochgradige, morphologische Veränderungen sichtbar.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material/ Gewebe**

#### **2.1.1 SCCx43KO-Mäuse und WT-Mäuse**

In dieser Arbeit wurde Hodenmaterial von präpubertären, homozygoten SCCx43KO-Mäusen und WT-Mäusen (per Definitionem Tiere die das Cre-Gen nicht tragen) im Vergleich untersucht. Die Versuchstierhaltung erfolgte im Tierstall der Philipps-Universität Marburg unter kontrollierten Bedingungen. Der Tierversuch wurde beim Regierungspräsidium Gießen vorschriftsmäßig angezeigt (Geschäftsnummer: V54 – 19 c 20/15 c GI 18/1). Es wurde Hodengewebe von acht Tage alten Tieren verwendet. Lediglich für die Dmrt7-IF wurden Hoden von 15 Tage alten Tieren genutzt, da das Protein erst ab Tag 14 im Mäusehoden exprimiert wird (Kim et al. 2007b). Die Mäuse wurden zunächst mit Hilfe von Schwanzbiopsien genotypisiert. Nach der Tötung und Entnahme der zwei Hoden wurde je einer für die Gewinnung der RNA schockgefroren, während der andere für die Erstellung histologischer Schnitte nach Fixierung in Paraffin eingebettet wurde. Für jede Methode wurden mindestens drei biologische Replikate für jeden Genotyp erstellt.

##### **2.1.1.1 Gewinnung des Schwanzbiopsats**

Um die Mäuse genotypisieren zu können, wurde mit einer Schere eine ca. 3-5 mm große Biopsie der Schwanzspitze genommen. Zwischen den einzelnen Biopsientnahmen von unterschiedlichen Tieren wurde die Schere mit 100%igem Alkohol gereinigt.

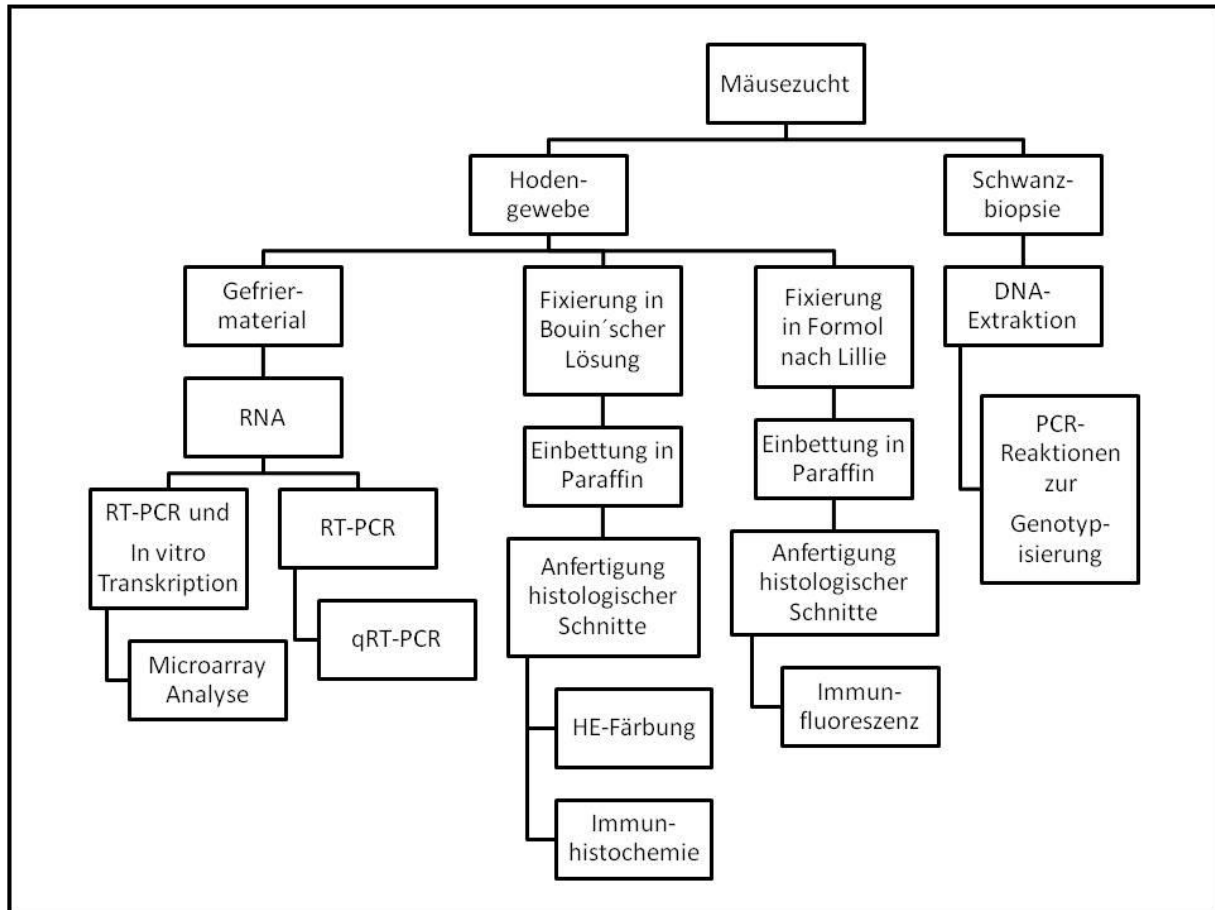
##### **2.1.1.2 Hodengewebsentnahme und Bestimmung des Hodengewichtes**

Vor der Euthanasie wurde das Gesamtgewicht des Tieres bestimmt und danach der entnommene Hoden gewogen und das relative Hodengewicht errechnet.

Die Mäuse wurden zur Hodenentnahme mit einer Überdosis aus Ketamin Hydrochlorid und Xylazin intra peritoneal eingeschláfert. Anschließend wurden sofort beide Hoden entnommen.

## 2.2 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet (s.Abb.14).



**Abbildung 14: Überblick über die verwendeten Methoden.**

### 2.2.1 Behandlung der Mäuseschwanzbiopsien und DNA-Extraktion

Die von den Mäusen gewonnenen Schwanzbiopsate wurden sofort in ein mit 200 µl Viagen Direct PCR-Tail gefülltes Mikroreaktionsgefäß gegeben.

Im Labor wurden je Probe 20 µl Proteinase K in einer Konzentration von 4 µg/µl hinzugefügt und nach sorgfältigem Mischen die Proben über Nacht in 55°C warmem Wasserbad inkubiert. Am folgenden Tag kamen die Proben für 45 Minuten in ein auf 85°C vorgeheiztes Wasserbad, um die Proteinase K zu inaktivieren. Nach dem Mischen und dem anschließenden

Zentrifugieren wurde nur der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß gegeben und die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

### 2.2.2 Genotypisierung der genutzten Mäuse

Für die Detektion des Genotyps der verwendeten Mäuse wurden je zwei PCR-Reaktionen mit anschließender Agarosegelaufentrennung und Fotodokumentation durchgeführt. Einerseits wurde dabei auf das Vorhandensein der Cre-Rekombinase getestet, andererseits wurde überprüft, ob es sich bei dem Tier um ein homozygot (beide Allele gefloxt)-, heterozygot (ein Allel gefloxt)- oder nicht „gefloxtes“ Tier handelte. Es ergaben sich folgende drei Genotypvarianten:

Cre-positiv + homoflox => SCCx43KO<sup>-/-</sup> oder homozygot KO

Cre-positiv + heteroflox => SCCx43KO<sup>-/+</sup> oder heterozygot KO

Cre-negativ + homoflox => WT

Für alle Experimente wurden ausschließlich homozygote KO Tiere (SCCx43KO<sup>-/-</sup>) und als Vergleichstiere Mäuse ohne Cre-Rekombinase verwendet. Wenn möglich wurden in den Experimenten Brüder verwendet.

Es wurden folgende Primerpaare zur Genotypisierung der Nachzucht genutzt:

**Tabelle 1: Für die Genotypisierung verwendete Primer.**

Name Primer	Primersequenzen
<b>Cre vorwärts</b>	5'GCAGGCGCAGGAGCTGGTGC 3'
<b>Cre rückwärts</b>	5'CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG 3'
<b>Flox vorwärts</b>	5'TCATGCCCCGGCACAAGTGAGAC 3'
<b>Flox rückwärts</b>	5'TCACCCCAAGCTGACTCAACCG

#### 2.2.2.1 PCR zur Detektion der Cre-Rekombinase „Cre PCR“

Es wurde auf Eis und mit gestopften Pipettenspitzen ein Mastermix in folgendem Lösungsverhältnis hergestellt:

15 µl	Steriles Aqua bidest
5 µl	GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer (5xGreen)
2 µl	MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	dNTP Mix
0,5 µl	Cre Primer, vorwärts
0,5 µl	Cre Primer, rückwärts
0,5 µl	GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase
24 µl	Gesamtvolumen für einen Ansatz.

Es wurden für die PCR-Reaktion je 1 µl DNA vorgelegt und dann 24 µl Mastermix hinzugegeben und gemischt. Die Amplifikation fand im T3 Thermocycler mit folgenden Schritten statt:

2 Minuten	95°C Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge	
30 Sekunden	95°C Denaturierung der DNA-Doppelstränge	} x40
30 Sekunden	55°C Anlagerung der Primer	
30 Sekunden	72°C Amplifikation der DNA	
7 Minuten	72°C Finale Amplifikationsphase	
Unendlich	4°C Kühlung der Produkte	

#### 2.2.2.2 PCR zur Detektion der LoxP-Elemente „Flox-PCR“

Es wurde auf Eis und mit gestopften Pipettenspitzen ein Mastermix in folgendem Lösungsverhältnis hergestellt:

15,35 µl	Steriles Aqua bidest
5 µl	GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer (5xGreen)
2 µl	MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	dNTP Mix
0,5 µl	Flox-Primer, vorwärts
0,5 µl	Flox-Primer, rückwärts
0,15 µl	GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase
24 µl	Gesamtvolumen für einen Ansatz.



Es wurden für die PCR-Reaktion je 1 µl DNA vorgelegt, 24 µl Mastermix hinzugegeben und dieses gemischt. Die Amplifikation fand im T3 Thermocycler mit folgenden Schritten statt:

2 Minuten	95°C Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge	
45 Sekunden	95°C Denaturierung der DNA-Doppelstränge	} x40
45 Sekunden	64°C Anlagerung der Primer	
1 Minute 30 Sekunden	72°C Amplifikation der DNA	
5 Minuten	72°C Finale Amplifikationsphase	
Unbegrenzt	4°C Kühlung der Produkte	

#### 2.2.2.3 Gelelektrophorese der Cre- und Flox-PCR-Produkte

Nach der Amplifikation wurden die entsprechenden PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Der genaue Ablauf war wie folgt:

#### **Vorarbeiten:**

##### Herstellung von 10xTAE-Puffer Stammlösung:

Unter dem Abzug arbeiten.

48,4 g TrisBase

20,0 ml EDTA auf

700 ml mit Aqua bidest auffüllen.

Lösung mit Hilfe eines Magneten und eines Magnetrührers mischen.

11,4 ml Essigsäure hinzugeben und auf

990 ml mit Aqua bidest auffüllen.

Mit Hilfe des pH-Meters und Essigsäure den pH auf 8,4 einstellen und auf

1000 ml mit Aqua bidest auffüllen.

##### Herstellung von 1xTAE-Puffer Gebrauchslösung:

1 Teil 10xTAE-Puffer Stammlösung mit

9 Teilen Aqua bidest mischen und dann den pH mit Hilfe von Essigsäure bzw. NaOH auf 8,4 einstellen.

#### 2.2.2.3.1 Erstellen eines Agarose-Gels

Dazu wurden auf der elektronischen Analysenwaage in einem Erlenmeyerkolben 0,6 g (für Produkte der LoxP-PCR) bzw. 0,45 g (für Produkte der Cre-PCR) Agarose abgewogen und zusammen mit 30 ml 1xTAE-Puffer Gebrauchslösung in der Mikrowelle aufgekocht. Dies ergab ein 1,5%iges Gel für die Cre-PCR und ein 2%iges Gel für die zur Detektion der LoxP-Elemente. Zum Abkühlen wurde der Erlenmeyerkolben auf einen Plattenrüttler verbracht. Unter Schwenken wurden 3 µl GelRed<sup>TM</sup>Nucleic Acid Gel Stain hinzugegeben und die Flüssigkeit in ein Geltablett mit aufgesetztem Probekamm gegossen, welches zuvor mit Gummi-Endblöcken abgedichtet wurde. Nach dem Auskühlen des Gels wurde der Probekamm und die Gummi-Endblöcke entfernt, das Geltablett in die Elektrophoresekammer gehängt und mit 1xTAE-Laufpuffer übergossen, bis dieser ca. 1 cm über dem Gel stand.

#### 2.2.2.3.2 Vorbereitung der PCR-Produkte und des Markers

##### Verdünnung der PCR-Produkte:

Die Reaktionsprodukte der PCR wurden wie folgt mit Aqua bidest verdünnt:

25µl Cre-PCR-Produkt + 20 µl Aqua bidest.

25µl LoxP-PCR-Produkt + 110 µl Aqua bidest

##### Herstellung des Markers:

1 µl 1 kb DNA Ladder mit

2 µl 6x DNA Loading Dye und

9 µl Aqua bidest vermischen.

#### 2.2.2.3.3 Auftrennung der PCR-Produkte und Dokumentation

Die Produkte wurden in der Agarosegel Mini Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die benötigte Spannung wurde mit dem Gerät PowerPac200 erzeugt.

Die Laufzeit betrug jeweils 45 Minuten bei 120 Volt.

Das Ergebnis der Agarosegelauftrennung wurde mit dem Transilluminator dargestellt, fotografiert und gespeichert. Mit Hilfe des Thermal Printers wurden die Ergebnisse auf Fotopapier gedruckt und anschließend archiviert.

#### 2.2.3 Gefrorenes Gewebe

Ein Hoden wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Eisschrank gelagert und zur Gewinnung der RNA für Microarray und qRT-PCR verwendet.

#### 2.2.4 Paraffin-eingebettetes Gewebe

Der zweite Hoden wurde entweder in Bouin'sche Lösung oder „neutral gepuffertes Formol nach Lillie“ fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus diesem vorbehandelten Material wurden Schnitte für HE-Färbung, verschiedene IHC und die IF erstellt.

### **Vorarbeiten:**

#### Herstellung von neutral gepuffertem Formol nach Lillie:

Formalin (37%)	500 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	32,5 g
Aqua dest	4500 ml

Dies ergab 5 l. Die Gesamtlösung sollte einen pH von 7,0 aufweisen.

#### Herstellung von 0,1 m Phosphatpuffer (PBS):

NaCl	41 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                      2,75 g mit  
Aqua bidest                    auf 1 l auffüllen

Dies ergab eine Gebrauchslösung mit einem pH von 7,2.

#### Herstellung von Bouin'scher Lösung:

15 Teile Pikrinsäure mit  
5 Teilen Formalin (37%) vermischen und erst kurz vor Gebrauch  
1 Teil Essigsäure 100% (Eisessig) hinzugeben.

#### Herstellung von 70 (50)%igem Alkohol

Alkohol 100%, vergällt        700 (500) ml mit  
Aqua bidest                      300 (500) ml vermischen.

#### 2.2.4.1 Fixation in Bouin'scher Lösung

Der in Bouin'scher Lösung fixierte Hoden wurde nach 24 Stunden in Plastikbiopsiekörbchen verbracht und mehrere Male an darauf folgenden Tagen in 70%igem Alkohol gewaschen. In Abhängigkeit von der Hodengröße (Tag acht oder 14 p.p.) betrug die Zeit zwei bis fünf Tage. Wenn der genutzte Alkohol keine gelben Verfärbungen mehr zeigte, wurde das Gewebe der Entwässerung zugeführt, um anschließend in Paraffin eingebettet zu werden.

#### 2.2.4.2 Fixation in Formalin

Die in „Formol nach Lillie“ eingelegten Hoden wurden nach zwei Stunden in Plastikbiopsiekörbchen verbracht, in einer großen Küvette mit Leitungswasser für eine Stunde gewässert und anschließend über Nacht in PBS Puffer eingelegt. Am darauf folgenden Tag wurden sie für 1-2 Stunden in 50%igen Alkohol verbracht und dann in 70%igem Alkohol, bis zum Einbetten in Paraffin, eingelegt.

#### 2.2.4.3 Einbettung der Proben in Paraffin

Die Einbettung der Proben in Paraffin geschah im Entwässerungsgerät. Die Proben wurden zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und gehärtet. Darauf erfolgte eine

Zwischenbehandlung mit Xylol, welches sowohl mit Paraffin als auch mit Alkohol mischbar ist. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Proben in 59°C heißes Paraffin gegeben und mit diesem durchtränkt.

Das genaue Programm lautete wie folgt:

80% Ethanol	2 Stunden	RT	
96% Ethanol	2 Stunden	RT	
100% Ethanol	je 3 Stunden	RT	3x
Xylol	1 Stunde	RT	
Xylol	je 45 Minuten	RT	2x
Paraffin	je 40 Minuten	59°C	3x

Das Einbetten der Proben in Paraffin erfolgte an der Ausgießstation. Dazu wurden die Proben aus den Plastikbiopsiekörbchen im Paraffinbad genommen, in die Vertiefung von Metallförmchen gelegt und die Form mit Paraffin ausgegossen. Anschließend wurde eine zuvor beschriftete Einbettkassette aufgedrückt und die Form auf die Kühlplatte zum Aushärten geschoben. Nach dem Aushärten des Paraffins wurden die Metallförmchen entfernt und die fertigen Blöckchen bis zum Anfertigen der Schnitte bei RT gelagert.

#### 2.2.4.4 APES-Beschichtung der Objektträger (OT)

Vor dem Aufbringen von Paraffinschnitten auf die OT wurden diese, um eine bessere Haftung der Schnitte zu erhalten, nach folgendem Protokoll behandelt:

OT in Halterung einsortieren

OT in Küvette mit Aceton eintauchen

OT abtropfen lassen

OT in Küvette mit 500 ml Aceton und 10 ml APES für 4-5 Minuten eintauchen

OT in Küvette mit reinem Leitungswasser für 4-5 Minuten eintauchen

OT in Küvette mit fließendem Leitungswasser für 4-5 Minuten eintauchen

OT in Küvette mit Aqua bidest für 4-5 Minuten eintauchen

OT abtropfen lassen

OT in Wärmeschrank (37°C) stellen bis diese trocken waren (24-48 Stunden). Dabei war dafür Sorge zu tragen, dass die OT nicht zusammenklebten.

#### 2.2.4.5 Herstellung histologischer Schnitte

Sowohl für die HE-Färbung, als auch für die IHC und die IF wurden mit Hilfe des Leica Schlittenmikrotoms 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Mit einem Pinsel wurden diese dann in ein 40°C heißes Paraffinstreckbad (Wasserbad) verbracht. Von hier aus wurden je zwei Schnitte auf einen mit APES beschichteten OT gezogen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

#### 2.2.4.6 HE-Färbung

Um eine histologische (morphologische) Beurteilung der Schnitte durchführen zu können, wurde zunächst eine HE-Färbung von jedem Paraffinblöckchen durchgeführt.

Die Färbung beinhaltete folgende Schritte:

OT in Küvettenhalter einsortieren

3x 10 Minuten Xylol

1x 5 Minuten Ethanol 100%

1x 5 Minuten Ethanol 96%

1x 5 Minuten Ethanol 70%

1x 5 Minuten Ethanol 50%

1x 5 Minuten Aqua dest

10-20 Sekunden Hämatoxylin (Shandon Instant Hematoxylin)

10 Minuten fließendes Leitungswasser

7 Minuten Eosin (Shandon Instant Eosin)

kurz schwenken Leitungswasser

kurz schwenken Ethanol 70%

kurz schwenken Ethanol 80%

1x 2 Minuten Ethanol 80%

2x 2 Minuten Ethanol 96%

3x 2 Minuten Ethanol 100%

3x 10 Minuten Xylol

Nach dem Färben wurden die Präparate mit Hilfe des Eindeckmediums Vitro-Clud eingedeckt.

#### 2.2.4.7 Lichtmikroskopie und quantitative Bestimmung der SZ- und KZ-Zahl je Tubulus

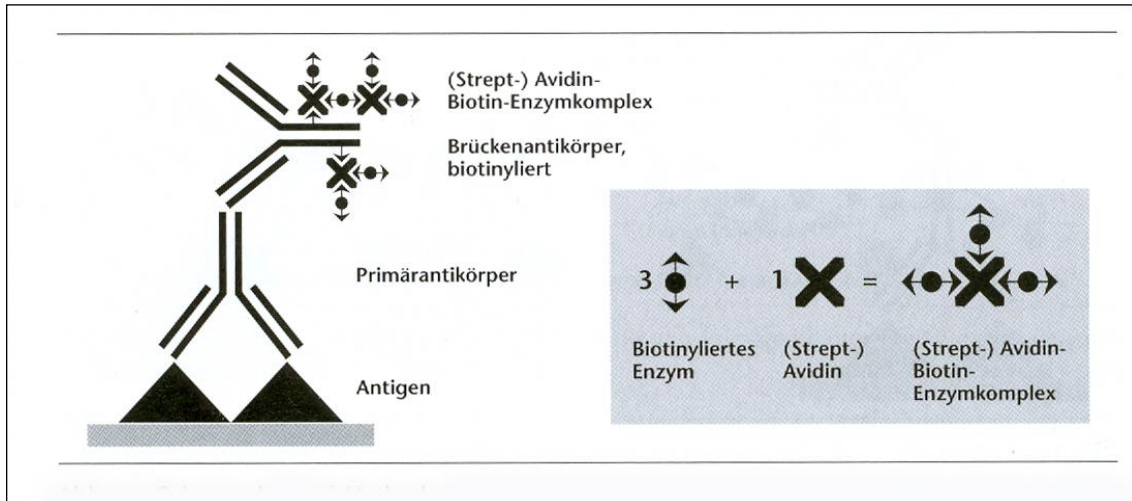
Für die lichtmikroskopische Auswertung und das Auszählen der KZ und SZ wurden nach dem beschriebenen HE-Protokoll von den drei WT Mäusen und den drei SCCx43KO Mäusen, die auch für den Microarray genutzt wurden, Schnitte angefertigt. Mit Hilfe des Leica Mikroskops und einer 400-fachen Vergrößerung wurde von mindestens 25 Tubulusquerschnitten pro Maus die Anzahl der SZ und KZ pro Tubulus bestimmt.

#### 2.2.4.8 Statistische Auswertung der erhobenen Daten (Zellzahlen)

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Herrn Dr. Klaus Failing, AG Biomathematik und Datenverarbeitung, Justus-Liebig-Universität Gießen, unter Zuhilfenahme der Software „BMDP Statistical Software Package“. Es wurde die durchschnittliche Anzahl der SZ und KZ pro Tubulus von jeder der sechs Mäuse bestimmt. Mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse wurde überprüft, ob es zwischen den Mäusen eines Genotyps bzw. zwischen den beiden Genotypen einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der SZ gab. Um dieselbe Fragestellung für die KZ-Anzahl zu beantworten wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet. Basierend auf den erhobenen Daten wurden Faktoren berechnet, um die aus der Microarray-Analyse gewonnenen Genexpressionsdaten um die mögliche differente Anzahl der KZ zu korrigieren. Die Korrekturfaktoren waren  $1/(\emptyset \text{KZ Zahl pro Tubulus})$  für KZ-spezifische Gene und  $1/(\emptyset \text{KZ Zahl} + \emptyset \text{SZ Zahl pro Tubulus})$  für Gene die sowohl in KZ als auch in SZ exprimiert werden.

### 2.2.5 Allgemeine Vorbemerkung zur IHC

Bei der in dieser Arbeit genutzten Form der Immunfärbung wurde die so genannte ABC-Methode verwendet. Es handelt sich um ein hoch sensitives System, um an Antigene gebundene Antikörper sichtbar zu machen. Bei dieser Methode bindet zunächst ein unmarkierter primärer Antikörper an das Antigen im Präparat.



**Abbildung 15: Schema der ABC Methode.**

**Durch die Nutzung des Biotin-gekoppelten, sekundären Antikörpers wird die ursprüngliche Antigen-Antikörperreaktion verstärkt sichtbar gemacht (modifiziert nach Noll und Schaub-Kuhnen 2000).**

An diesen koppelt wiederum ein biotinylierter sekundärer Antikörper. Avidin bindet mit hoher Affinität an Biotin, so dass Avidin gekoppelte enzymatische Amplifikationssysteme, in diesem Fall eine Peroxidase genutzt werden können. Die Umsetzung eines Substrats durch das Enzym zeigt dann die Bindungsstelle des Primärantikörpers in verstärkter Form (s.Abb.15). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit geschah dies durch eine Farbreaktion. Bei allen durchgeführten Immunfärbungen wurde ein zweiter Schnitt auf dem OT als Negativkontrolle mitgeführt. Auf diesem wurde anstatt des primären Antikörpers BSA-Blockpuffer aufgebracht, wobei alle folgenden Schritte identisch bei Positiv- und Negativkontrolle realisiert wurden.



### 2.2.6 $\beta$ -Galaktosidase-IHC

Die  $\beta$ -Galaktosidase- Immunfärbung stellt einen indirekten Nachweis der Cre- Rekombinase- Aktivität dar. Die in dieser Studie genutzten Mäuse der LoxP-Linie tragen ein stilles LacZ- Gen. Dieses kodiert für das Protein  $\beta$ -Galaktosidase. Das Gen wird nur aktiv, d.h.

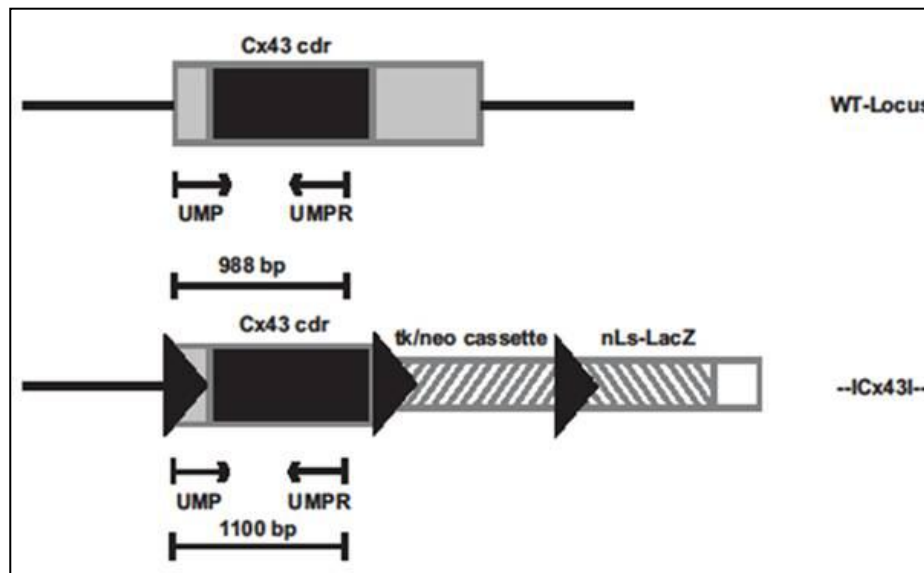


Abbildung 16: Schema der WT-Genstruktur und dem gefloxten Genkonstrukt.

Solide Boxen: transkribierte Region. Hellgraue Boxen: untranslatierte Region. Schwarze Boxen: Cx43-kodierende Region (Cx43 cdr=Exon 2), Selektion Marker Kassette (tk/neo) und lacZ Reporter Gen (nLs lacZ). nLs: Kern-Lokalisierungs-Sequenz. Pfeilspitzen: loxP-Elemente. Die schmalen Pfeile zeigen Position und Richtung der Primer welche für die PCR genutzt wurden (UMP and UMPR) --lCx43I-- = gefloxed Allele (modifiziert nach Theis et al. 2000).

transkribiert, wenn zuvor das LoxP-flankierte Cx43-Gen entfernt wurde. Dies bedeutet, dass nur Zellen, in denen das Cre-Gen exprimiert wird und in denen mindestens ein Cx-Allel mit LoxP ausgeschnitten ist, positiv reagieren (s.Abb.16).

Das genaue immunohistochemische Protokoll zur  $\beta$ -Galaktosidase-IHC (ab616, Abcam, Cambridge, UK) lautete wie folgt:

#### Vorarbeiten:

##### Herstellung von Waschpufferstamlösung (Tris-HCl):

121,1 g      Tris-HCl

58,4 g NaCl auf

850 – 900 ml mit Aqua bidest auffüllen.

Mit Hilfe von konzentrierter Salzsäure auf den pH 7,4 einstellen und auf

1 l mit Aqua bidest auffüllen. Mischschritte mit Hilfe eines Magneten und eines Magnetrührers durchführen.

#### Herstellung von Waschpuffer (Tris-HCL-Puffer):

100 ml Stammlösung

900 ml Aqua Dest

250 µl Triton-X 100 mit Hilfe einer Verdrängungspipette hinzugeben und solange weiter rühren lassen, bis es sich aufgelöst hat. Mischschritte mit Hilfe eines Magneten und eines Magnetrührers durchführen.

#### Herstellung von Bovines Serumalbumin(BSA) - Blockpuffer:

1 g BSA mit

70 ml Tris-HCL-Puffer vermischen, dann

21 µl Triton-X 100 darin auflösen. Mischschritte mit Hilfe eines Magneten und eines Magnetrührers durchführen.

#### Herstellung von ABC-Elite Kit Standard-Gebrauchslösung:

Immer mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch ansetzen.

1 ml Tris-HCl-Puffer-Gebrauchslösung mit

16 µl Lösung A (aus dem Kit)

16 µl Lösung B (aus dem Kit) vermischen.

#### Herstellung von Peroxidase Substrat Kit DAB-Gebrauchslösung

Das DAB-Färbesubstrat immer erst kurz vor Gebrauch ansetzen. Unter dem Abzug mit Handschuhen arbeiten.

300 µl Substratpuffer (aus dem Kit) mit  
1 Tropfen DAB-Lösung vermischen.

a) Deparaffinieren und Rehydrieren:

OT in Küvettenhalter einsortieren und nacheinander in folgende Lösungen eintauchen:

3x 10 Minuten Xylol

1x 5 Minuten Ethanol 100%

1x 5 Minuten Ethanol 96%

1x 5 Minuten Ethanol 70%

1x 5 Minuten Ethanol 50%

1x 5 Minuten Aqua dest

b) Hitzedemaskieren der Antikörperbindungsstellen

Es wurde keine Vorbehandlung durchgeführt.

c) Blockieren der endogenen Peroxidase

OT in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (54 ml Tris-HCL-Puffer mit 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) für 30 Minuten auf dem Rüttler blocken.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

d) Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen

In BSA-Blockpuffer für 30 Minuten auf dem Rüttler inkubieren.

e) Inkubation mit primärem Antikörper

OT um Schnitte herum trocken wischen, Präparate mit Dako Pen umzeichnen und in feuchte Inkubationskammer legen.

Je auf einen Schnitt 50 µl des primären  $\beta$ -Galaktosidase-Antikörpers aus dem Kaninchen (1:1000 mit BSA-Blockpuffer verdünnt) pipettieren. Der andere Schnitt auf dem OT diene als Negativkontrolle und wurde nur mit 50 µl Blockpuffer bedeckt. Über Nacht in der Inkubationskammer im Kühlschrank bei 4°C inkubieren.

f) Inkubation mit sekundärem Antikörper

Primäre Antikörper auf Papier abkippen und OT in Küvette mit Waschpuffer einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT wieder um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte 50 µl biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:400 mit BSA-Blockpuffer verdünnt) aufbringen. Dann 60 Minuten in der Inkubationskammer bei RT inkubieren lassen

g) Inkubation mit ABC-Elite Kit Standard, Vector Vectastain (ABC-Kit)

Sekundären Antikörper auf Papier abkippen und OT wieder in Küvette einsortieren.

3 x 3 Minuten Waschpuffer auf dem Rüttler waschen. OT um Präparate herum trocken wischen, in Inkubationskammer legen und dann auf beide Schnitte 1-2 Tropfen ABC-Gebrauchslösung aufbringen. Dann 60 Minuten bei RT in Inkubationskammer inkubieren lassen.

h) Farbreaktion

ABC-Gebrauchslösung auf Papier abkippen und OT wieder in Küvette einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT wieder um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl DAB-Färbesubstrat aufbringen. 3-6 Minuten einwirken lassen, dabei Färbung unter dem Mikroskop überwachen.

Mit Aqua dest abspülen und in Küvette mit Aqua dest stellen.

3 x 3 Minuten in Aqua dest auf dem Rüttler waschen.

i) Gegenfärben

Zum Gegenfärben wurden die OT aus der Küvette mit Aqua dest genommen, je Präparat 1 Tropfen Hämatoxylin (1:1 mit Aqua dest verdünnt) aufgebracht und dieses nach 6 Sekunden in Becherglas mit Leitungswasser abgewaschen. Anschließend wurden die OT in eine Küvette mit Leitungswasser verbracht und diese 3x mit frischem Leitungswasser aufgefüllt. Im letzten Schritt wurde das Leitungswasser gegen Aqua dest ausgetauscht.

j) Eindecken der OT

Nach dem Färbevorgang wurden die Präparate mit Hilfe von Glyceringelatine eingedeckt. Dazu wurde diese in einem Wasserbad erhitzt und ein bis zwei Tropfen auf den OT aufgebracht. Auf diese wurde ein Deckgläschen unter Ausschluss von Luft gedrückt und ein Bleigewicht aufgelegt. Nach dem Festwerden wurden die OT fotografiert und bei RT in Kästen gelagert.

## 2.2.7 Extraktion und Isolation von RNA aus Gefriermaterial

### 2.2.7.1 Stabilisierung der RNA

Um die RNA während der Verarbeitung vor Degradierung zu schützen wurde RNAlater<sup>®</sup>-ICE verwendet. Dazu werden zunächst 1,5 ml RNAlater<sup>®</sup>-ICE in ein RNase freies Schraubtube verbracht und bei -80°C vorgekühlt. Am folgenden Tag wurde der gefrorene Hoden hinzugegeben und das Reaktionsgefäß für mindestens 24 Stunden bei -20°C gefroren. Das so behandelte Gewebe konnte bei Raumtemperatur bis zu einer halben Stunde bearbeitet werden, ohne dass es zu einem Qualitätsverlust der RNA kommt.

### 2.2.7.2 Extraktion der RNA

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Micro<sup>®</sup> Kits isoliert. Die einzelnen Arbeitsschritte waren wie folgt:

### **Vorbereitung des Arbeitsplatzes:**

Unter dem Abzug RNase-freien Arbeitsplatz durch Reinigung mit Ethanol und anschließend mit RNase-AWAY<sup>®</sup> Reagent sicherstellen.

Es wurden nur RNase freie Geräte und Materialien genutzt; diese wurden entweder bereits gebrauchsfertig geliefert oder es erfolgte eine Sterilisierung von Gegenständen aus Glas und Metall bzw. Autoklavierung der genutzten Flüssigkeiten und Gegenstände aus Plastik.

### **Vorbereitung der benötigten Reagenzien:**

#### Herstellung von RLT-Puffer:

10 µl β-Merkaptoethanol mit  
1000 µl RLT-Puffer-Stammlösung durch Pipettenpassage mischen.

#### Herstellung von RPE-Puffer:

Vor der ersten Nutzung wurden 4 Volumeneinheiten 96-100%iges Ethanol zugegeben, um die Arbeitslösung herzustellen.

#### Herstellung von 70%igem Ethanol:

70 ml 96-100%iges Ethanol mit  
30 ml RNase-freiem Wasser mischen.

#### Herstellung von 80%igem Ethanol:

24 µl 96-100%iges Ethanol mit  
6 µl RNase-freiem Wasser mischen.

#### Herstellung von DNase-Stammlösung:

Die im Kit enthaltene DNase I wurde in  
550 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Mischung wurde in 40 µl Aliquots aufgeteilt und diese bei –20°C gelagert.

#### 2.2.7.2.1 Extraktion

- a) Das in RNAlater<sup>®</sup>-ICE eingelegte Gewebe wurde mit einer Pinzette heraus genommen und gewogen. War es schwerer als 5 mg wurde der Überschuss mit Hilfe einer Rasierklinge abgetrennt und wieder bei –20°C gefroren.
- b) Verbringen des Gewebes in ein 2 ml Schraubdeckeltube und Zugabe von 350 µl RLT-Puffer.
- c) Homogenisierung des Gewebes mit Hilfe des Ultra-TURRAX<sup>®</sup>.
- d) Zentrifugation für 3 Minuten bei „Full Speed“ (140.000 UpM).
- e) Übertragung des Überstandes in ein neues 2 ml Schraubdeckeltube und Zugabe einer Volumeneinheit (350 µl) 70%igen Ethanol. Mischung durch Pipettenpassage.
- f) Transfer der Lösung mit allen evtl. gebildeten Präzipitaten zu einem Rneasy MinElute spin column, welches in einem 2 ml Sammeltube steckt (im Kit enthalten). Vorsichtiger Verschluss des Deckels und Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 UpM, Verwurf des Durchflusses.
- g) Zugabe von 350 µl RW1-Puffer zu der Rneasy MinElute spin column, vorsichtiger Verschluss des Deckels und Zentrifugation für 15 Sekunden bei  $\geq 10.000$  UpM, um das Säulchen zu waschen, Verwurf des Durchflusses.
- h) Zugabe von 10 µl DNase I Stammlösung zu 70 µl RDD-Puffer, durch vorsichtiges Kippen des Tubes mischen.
- i) Zugabe von 80 µl DNase I Inkubations-Mix direkt auf die Säulchenmembran, und Platzierung auf der Arbeitsfläche (20°C-30°C) für 15 Minuten.
- j) 350 µl RW1-Puffer auf die Rneasy MinElute spin column geben. Vorsichtig wieder den Deckel schließen und für 15 Sekunden bei  $\geq 10.000$  UpM zentrifugieren, um das Säulchen zu waschen; Durchfluss und Sammeltube wegwerfen.
- k) Platzierung des Säulchens in einem neuen 2 ml Sammeltube. Zugabe von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule. Vorsichtiger Verschluss des Deckels und Zentrifugation für 15 Sekunden bei  $\geq 10.000$  UpM um das Säulchen zu waschen, Verwurf des Durchflusses.

- l) Zugabe von 500 µl 80%igen Ethanol auf die Rneasy MinElute spin column. Vorsichtiger Verschluss des Deckels und Zentrifugation für 2 Minuten bei  $\geq 10.000$  UpM um das Säulchen zu waschen, Durchfluss und Sammeltube wegwerfen.
- m) Platzierung des Säulchens in ein neuen 2 ml Sammeltube. Zentrifugation des Säulchens bei geöffnetem Deckel bei "Full Speed" für 5 Minuten, Verwurf von Durchfluss und Sammeltube.
- n) Platzierung des Säulchens in einem neuen 1,5 ml Tube (im Kit enthalten). Gabe von 14 µl RNase-freiem Wasser direkt ins Zentrum der Spin column-Membran, vorsichtiger Verschluss des Deckels und Zentrifugation für 1 Minute bei „Full speed“ um die RNA herauszulösen.

#### 2.2.7.2.2 Messung des RNA-Gehaltes und Kontrolle der RNA-Qualität

Dazu wurde mit Hilfe des Biophotometers der RNA-Gehalt, das Verhältnis der Extinktionswerte(E) von 260nm/230nm und von 260nm/280nm bestimmt. Die Menge der isolierten RNA ist dabei proportional zur Erhöhung der optischen Dichte (Optische Dichte (OD)  $_{260nm}$  1=33 µg RNA/ml) der Flüssigkeit. Qualitativ hochwertige RNA hat eine  $E_{260nm}/E_{230nm}$  Rate zwischen 0,1-1,0 und eine  $E_{260nm}/E_{280nm}$  Rate zwischen 1,5 und 2,0.

#### **Vorarbeiten:**

##### Herstellung von Tris-HCL-Puffer:

1,21 g Tris-HCL in  
90 ml RNase-freiem Wasser lösen und mit  
konzentrierter Salzsäure auf pH 7,3 einstellen. Auf  
100 ml mit RNase-freiem Wasser auffüllen und in 1,7 ml-Portionen bis zum Gebrauch  
einfrieren.

Der genaue Ablauf war wie folgt:

Kunststoff-Einmalküvetten, UVette® mit  
69 µl Tris-HCL-Puffer füllen und Leerwert bestimmen.  
1 µl RNA hinzugeben, gut mischen und messen.  
Die übrige RNA wurde bei -80°C tiefgefroren.



## 2.2.8 Microarray

### 2.2.8.1 Allgemeine Vorbemerkungen zur Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse und die anschließende Auswertung der Daten wurde durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Chakraborty, Dr. Hossain und Dr. Markmann, aus dem Institut für Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, durchgeführt.

Diese Methode ermöglicht den gleichzeitigen Vergleich der Genexpression eines Genoms. Auf einen Chip (hier: CodeLink Mouse Whole Genome Bioarray) auf dem ~36,000 unterschiedliche Transkripte in einer Länge von 30 bp gebunden sind, wird die zuvor hergestellte, mit Biotin markierte cRNA hybridisiert.

Nach dem Auswaschen nicht gebundener cRNA-Moleküle und dem Färben mit Streptavidin gekoppelten Fluorophoren wird der Chip gescannt.

Dabei entspricht jeder Spot auf dem Array einem bestimmten Transkript. Die gemessene Leuchtintensität der einzelnen Spots ist proportional zu Genexpressionsstärke.

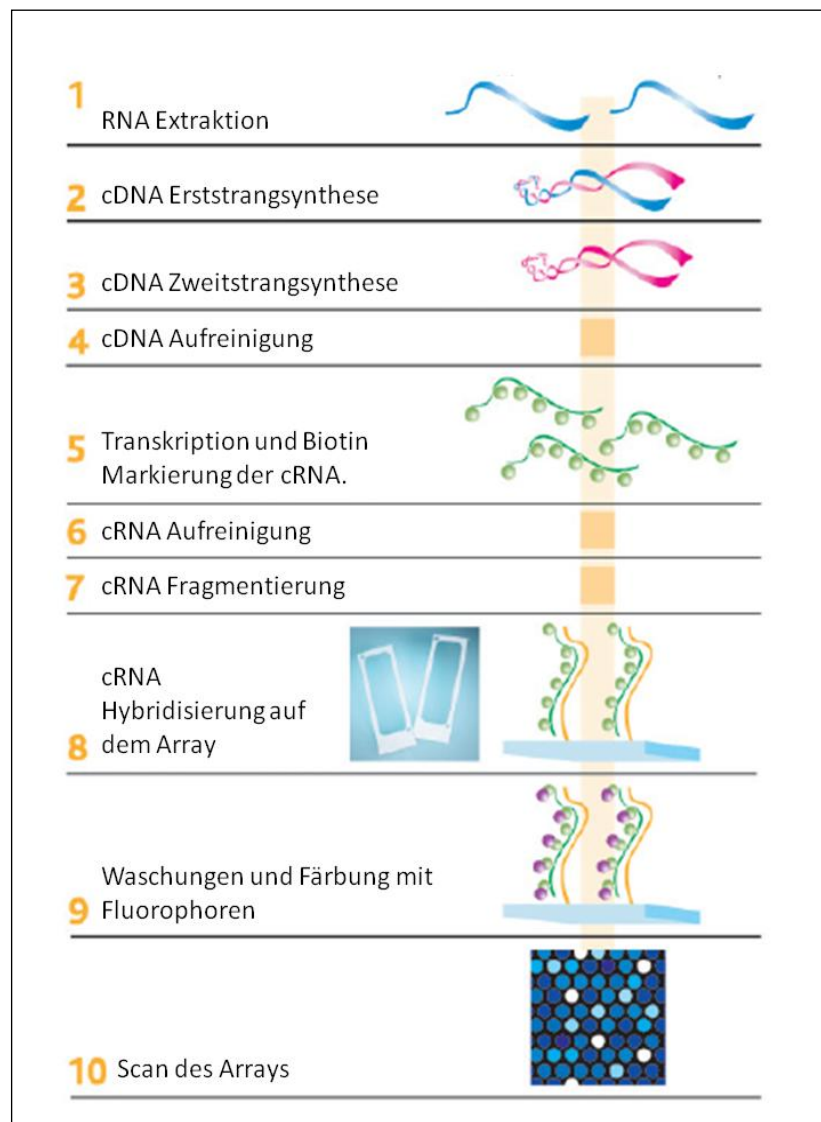
### 2.2.8.2 Verwendete Proben

Die Microarray-Analyse wurde zum Vergleich der Genexpression mit Hodenhomogenat von drei WT- und drei SCCx43KO-Mäusen durchgeführt. Dafür wurde für jedes Tier noch ein technisches Replikat, daher ein zweiter Microarray mit derselben cRNA prozessiert.

### 2.2.8.3 Herstellung von markierter cRNA

Wie in Abbildung 17 beschrieben, wurde zunächst von der extrahierten RNA cDNA synthetisiert. Für die Herstellung wurde das MessageAmp II Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde 1 µg RNA für die cDNA-Synthesereaktion genutzt.

Es wurden Poly-A bindende Primer, die den T7- Polymerase Promotor beinhalteten verwendet. Die Biotinylierung der cDNA wurde durch die Nutzung von 11-Bio-UTP (Biotin-gekoppelten Nukleotiden) sichergestellt. Die doppelsträngige cDNA und biotinylierte cRNA wurden durch Säulchen, die im Kit enthalten waren, aufgereinigt. Die aus dem Säulchen gelöste cRNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop quantitativ und mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer qualitativ gemessen und untersucht.



**Abbildung 17: Ablauf der Microarray-Analyse.**

**Schema des Vertreibers (modifiziert nach Applied Microarrays).**

#### 2.2.8.4 Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung auf dem Array

In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  wurden Portionen von je 20 µg cRNA der Fragmentierung zugeführt. Anschließend wurden 10 µg fragmentierte cRNA auf einen CodeLink Mouse Whole Genome Microarray appliziert und für 18 Stunden in einem Minitron shaker incubator bei 37°C° und 300 UpM hybridisiert.

#### 2.2.8.5 Waschungen und Färbung mit Fluorophoren

Waschungen und Färbung geschahen nach dem Originalprotokoll für CodeLink Arrays. Durch die Waschung wurden nicht gebundene cRNA Fragmente vom Array entfernt. Es folgte die Detektion der gebundenen Fragmente mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten Fluorophoren (Cy-5 gekoppeltes Streptavidin). Nicht gebundene Moleküle wurden auch nach diesem Schritt durch Waschungen entfernt. Die Plattformen wurden anschließend durch Zentrifugation getrocknet.

#### 2.2.8.6 Scan des IF-Signal, Hintergrundkorrektur und Intra-Array Normalisierung

Die Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des GenePix™ 4000 B und der GenePix Pro 4.0 Software gescannt. Die Quantifizierung der Spot-Signale wurde mit der CodeLink System Software, die aus der Batch Submission (V2.2.27) und der Expression Analysis (V2.2.25) besteht, nach Bedienungsanleitung durchgeführt. Sowohl Hintergrund-korrigierte Rohdaten, als auch die Intra-Array normalisierte Daten wurden von der CodeLink™ Expression Analysis 1.21 Software bereitgestellt.

Die Hintergrund-Korrektur eliminierte unspezifisches Leuchten aus der Analyse, während die Normalisierung der Daten notwendig war, um Unterschiede der Leuchtintensitäten auf einem Chip (Intra-Array Normalisierung) und zwischen den verschiedenen Chips (Inter-Array Normalisierung) auszugleichen und damit einen Vergleich zu ermöglichen.

Die Software kalkulierte automatisch Schwellenwerte für Intra-Array normalisierte Intensitäten für jeden Microarray und markierte Gene als „True“, wenn ihre Intensität höher als der Schwellenwert ist und als „False“, wenn ihre Intensität darunter lag. Der „Present call“ wurde aus der Anzahl der Gene die als „True“ detektiert wurden, geteilt durch die Gesamtzahl

der Gene auf dem Array errechnet. Microarrays, die der Datenanalyse unterworfen wurden, zeigten einen mittleren „Present call“ von 83%, daher lagen ein Großteil der Gene über dem Schwellenwert. Des Weiteren definierte die Software die Spots als „good“, „empty“, „poor“, „Neg“, oder „MSR“. Nur „good“ und „empty“ Spots wurden für die weitere Analyse verwendet (s.Abb.18).

#### 2.2.8.7 Weitere Auswertung und Qualitätskontrolle der Daten

Hierfür wurden zunächst zwei Gruppen definiert:

Gruppe 1: WT-Mäuse (drei biologische(n=3) und je Maus zwei technische Replikate)

Gruppe 2: SCCx43KO-Mäuse (drei biologische(n=3) und je Maus zwei technische Replikate)

Es wurden daher insgesamt zwölf Microarrays verglichen.

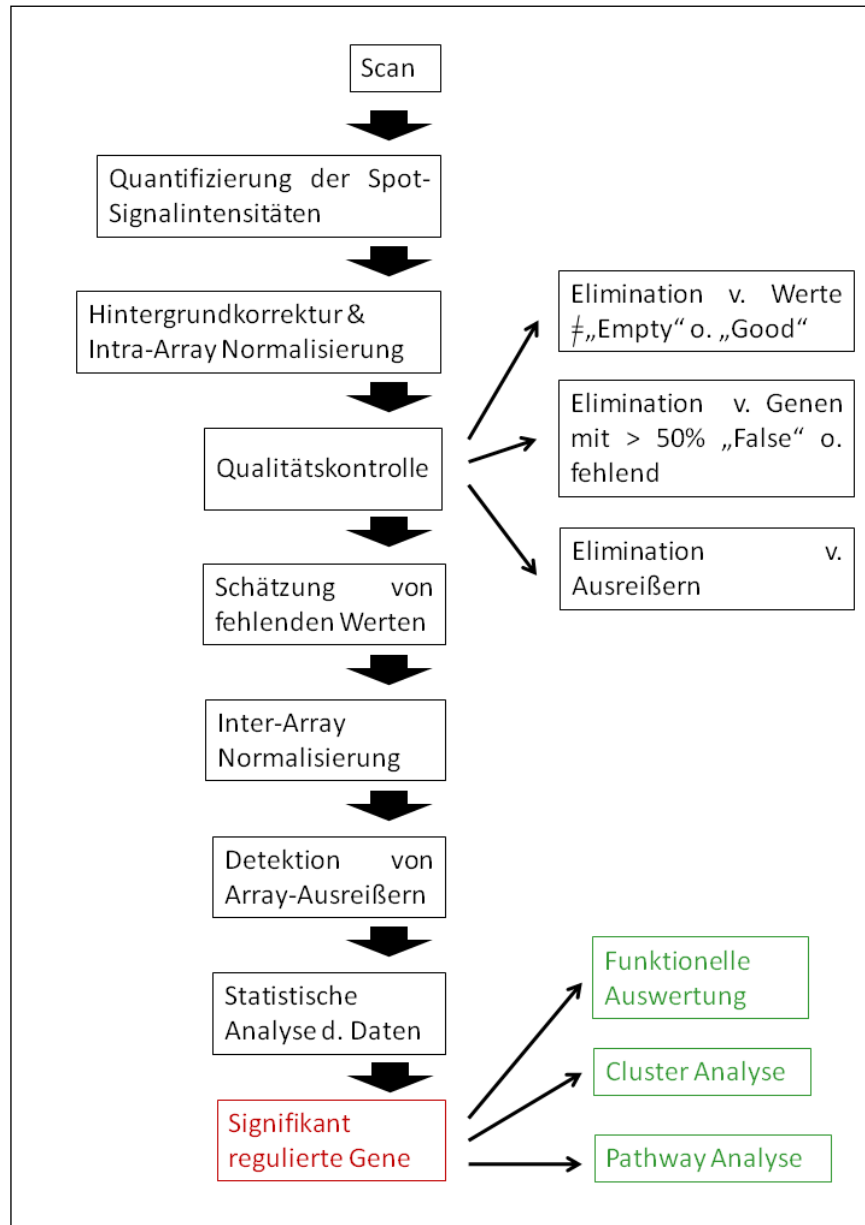
Anschließend wurden alle Gene mit einer hohen Anzahl von fehlenden (>50% in allen Arrays einer Gruppe) oder als „False“ (>50% der Arrays jeder Gruppe) markierten Werten aus der Analyse ausgeschlossen. Nach der Qualitätskontrolle blieben 26.044 Gene im Analyse-Datensatz.

Als Ausreißer wurden Genexpressionswerte mit einer mehr als 3-fachen Abweichung zum Gruppen-Median definiert und als solche entfernt.

Die Schätzung (Imputation) von fehlenden Werten zur Vervollständigung des Datensatzes geschah unter der Nutzung von „sequential K-nearest neighbour (SKNN) imputation“ mit K=5 (Kim et al. 2004).

Die darauf folgende Inter-Array-Normalisierung der Daten wurde als „quantile Normalisation“ in R (Bolstad et al. 2003) durchgeführt. R ist ein Werkzeug zur statistischen Analyse von Daten, ihrer grafischen Darstellung und die ihrer Ergebnisse.

Die Überprüfung, ob sich unter den Arrays Ausreißer befanden, wurde mit Hilfe von Unterschiedlichkeits-Matrizen der normalisierten Daten, die in AVADIS-Pride (Gwadry et al. 2005) erstellt wurden, realisiert. Unter den Arrays fanden sich keine Ausreißer.



**Abbildung 18: Auswertung des Microarray-Experiments.**

#### 2.2.8.7.1 Statistische Auswertung der Daten

Für jedes Gen wurde der Mittelwert der technischen Replikate und die Fold changes (FC) in MAYDAY (Battke et al. 2010) kalkuliert. Die statistische Analyse wurde unter Nutzung von

„Rank Products“ durchgeführt. „Rank Products“ ist ein biologisch motivierter Test um unterschiedlich exprimierte Gene in replizierten Microarray-Experimenten zu bestimmen (Breitling et al. 2004; Breitling und Herzyk 2005). Er basiert auf dem Rang (Rank) von FC. Um Unterschiede in der Genexpression zwischen den SCCx43KO-Tieren und WT-Tieren zu detektieren, wurde der Datensatz dazu in eine neue zwei-Klassen-Rang-Statistik importiert. Zusätzlich wurde noch ein t-Test durchgeführt. Bei den beiden Tests wurde die Signifikanzgrenze bei  $p < 0,05$  und einem  $FC \geq 2$  festgesetzt. In Abbildung 18 sind die verschiedenen Stadien der Analyse dargestellt.

#### 2.2.8.7.2 Funktionelle Auswertung der Daten

Für diese Analyse ist wichtig zu wissen, welches Protein von welchem Gen kodiert wird und welche Funktion es hat. Dieser Prozess der Zuordnung wird "Gen-Annotation" genannt. Die signifikant regulierten Gene wurden mit Hilfe der Internet-basierenden Annotations-Werkzeugen SOURCE (Diehn et al. 2003) und DAVID (**D**atabase for **A**nnotation, **V**isualisation and **I**ntegrated **D**iscovery) (Dennis et al. 2003) weiter untersucht. Dabei wurde DAVID (Version 2.0) auch dazu verwendet, unter den signifikant regulierten Genen solche Funktionskategorien herauszufiltern, die verhältnismäßig überrepräsentiert waren (d.h. sie tauchten öfter in der Liste der signifikant regulierten Gene auf, als ihre Häufigkeit auf dem Array vermuten lassen würde). Das Gen Ontology (GO) –Projekt ist eine große Bioinformatikinitiative mit dem Ziel, Geneigenschaften und die ihrer Produkte über verschiedene Spezies und Datenbanken hinaus zu standardisieren. Das GO- Konsortium, welches aus verschiedenen Datenbanken und Forschungsgemeinschaften gebildet wird, annotiert hierbei Gene nach ihrer Funktion. Es ist in drei Kategorien untergliedert: Molecular Function, Biological Process und Cellular Component. In dieser Studie wurde der Focus auf den „Biological Process“ gelegt. Die Schwellenwerte für diese Analyse wurden dabei auf „count=1“ und „EASE=0,1“ festgelegt. Es wurden solche Kategorien als überrepräsentiert angesprochen, die eine p-Wert (=EASE Score) unter 0,05 hatten.

#### 2.2.8.7.3 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse ist eine mathematische Methode zum Nachweis von Häufungen von Variablen in komplexen Datensätzen (Kraif et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde

eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt und jedes Gen zunächst als ein Cluster mit nur einem Element aufgefasst. Die am nächsten zueinander gelegenen Cluster wurden daraufhin zu einer Gruppe zusammengefasst, bis alle Cluster eine bestimmte Distanz zueinander überschritten oder eine ausreichend kleine Anzahl von Clustern ermittelt worden war. Die in dieser Arbeit genutzte „centroid linkage“ Methode benutzt zur Bestimmung des Abstands zweier Cluster deren Mittelwerte. Die Clusteranalyse der signifikant herunter- und heraufregulierten Gene wurde unter einer Distanz-Matrix von 1-r in dChip (Software zur Auswertung von Microarray-Daten) durchgeführt (Li und Wong 2001).

#### 2.2.8.7.4 Pathway-Analyse der Daten

Die Identifikation von Signalwegen, die von den signifikant regulierten Genen beeinflusst werden, wurde mit Hilfe des PathwayExplorer (Mlecnik et al. 2005) und der Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems) durchgeführt. Ziel dieser Analyse war, diejenigen biologischen Prozesse herauszufinden, die mit dem KO von Cx43 assoziiert sind und eine mögliche Rolle für den veränderten Phänotyp und die gestörte Spermatogenese der erwachsenen Tiere spielen. IPA ist eine Datenbank funktioneller Interaktionen, die bereits veröffentlichte, von Fachleuten überprüfte, Informationen zu diesen Genen enthält. Die Liste der signifikant veränderten Gene wurde verwendet, um theoretische Netzwerke und Pathways zu kreieren, wobei die IPA-interne Datenbank für „Maus“ als Hintergrund verwendet wurde. Es wird zwischen vordesignierten „Networks“, „Canonical Pathways“ und selbst-gebildeten Pathways unterschieden, die aus Gen- und Protein- Relation-Informationen verschiedener Quellen stammen, welche in IPA eingespeist wurden.

#### Funktionelle Analyse des gesamten Datensatzes:

Diese Funktion identifiziert diejenigen biologischen Funktionen und/ oder Krankheiten, die die größte Bedeutung in dem genutzten Datensatz haben. Der exakte Fischer-Test wurde verwendet, um den p-Wert zu berechnen, der die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass jede den Daten zugeordnete biologische Funktion und/ oder Krankheit nur auf Zufall beruht.

### „Network“-Bildung:

Eine Liste mit den Genkennungen und den entsprechenden Genexpressionswerten wurde auf die Datenbank geladen. Nachdem die Genkennungen mit der entsprechenden Kennung von IPA abgeglichen wurden, konnten die signifikant regulierten Gene in die „Ingenuity Pathway Knowledge Base“ eingespeist werden. „Netzwerke“ dieser Gene wurden dann basierend auf ihrer Verbundenheit algorithmisch generiert.

### Funktionelle „Network“-Analyse:

Diese Auswertung identifizierte die wichtigsten biologischen Funktionen und Krankheiten der Gene innerhalb der Netzwerke. Es wurden nur Daten von „Network“-Genen verwendet, denen eine biologische Funktion und/ oder Krankheit in der „Ingenuity Pathway Knowledge Base“ zugeordnet werden konnte.

Es wurde der exakte Fischer-Test verwendet, um den p-Wert zu berechnen, der die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass jede Zuordnung einer biologische Funktion und/ oder Krankheit zu einem Netzwerk nur auf Zufall beruht.

### „Canonical Pathway“-Analyse

Diese Aufgliederung identifiziert diejenigen „Pathways“ der IPA-Datenbank für „Canonical Pathways“, die die größte Bedeutung unter den verwendeten Daten haben. Die Signifikanz der Verbindungen zwischen Datensatz und „Canonical Pathways“ wurde auf zwei Wegen berechnet:

- 1) Zahl der Gene, die in den jeweiligen Pathway aufgenommen wurden, geteilt durch die Zahl der Gene die im jeweiligen „Canonical Pathway“ vertreten sind.
- 2) Der exakte Fischer-Test um den p-Wert zu berechnen, der die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass die Zuordnung eines Genes aus dem Datensatz zu einem „Canonical Pathway“ nur auf Zufall beruht.



### Selbst gebildete „Pathways“:

Es ist möglich, in die von dem Programm erstellten „Networks“ selber Gene einzuspeisen und diese von der Software in Verbindung mit den im Netzwerk bereits bestehenden Genen setzen zu lassen. Dazu nutzt auch hier das Programm die Informationen aus der „Ingenuity Pathway Knowledge Base“.

#### 2.2.9 RT-PCR

Um die in der Microarray-Analyse aufgedeckten Genexpressionsunterschiede zu verifizieren, wurde die aus WT- und SCCx43KO-Mäusen gewonnene RNA zunächst in cDNA umgeschrieben, welche anschließend in der qRT-PCR verwendet wurde. Für die cDNA-Synthese wurde die isolierte RNA zunächst auf eine Konzentration von 200 ng/ µl verdünnt. Es wurden jeweils 30 µl eingestellter RNA hergestellt. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde folgender RT-Mix Zusammensetzung verwendet:

2 µl	MgCl <sub>2</sub> Solution (25 mM)
1 µl	10xPCR-Puffer
4 µl	GeneAmp® 10 mM dNTP Mix with dTTP
0,5 µl	Random Hexamers
0,5 µl	RNase-Inhibitor (20U/µl)
0,5 µl	MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)
8,5 µl	Gesamtvolumen

Es wurden dann in einem Reaktionsgefäß jeweils 8,5 (85) µl RT-Mix + 1,5 (15) µl eingestellter RNA gemischt. Die Umschreibung fand nach folgendem Protokoll im Thermocycler statt:

8 Minuten	21°C Primeranlagerung
15 Minuten	42°C Transkription
5 Minuten	99°C Abbau der Reversen Transkriptase
5 Minuten	5°C Kühlung der Produkte
Unbegrenzt	4°C Aufbewahrung im Cycler

Zur Überprüfung auf Verunreinigungen mit genomischer DNA wurde noch ein Mix, wie beschrieben, jedoch mit 0,5 µl Aqua bidest anstatt der Reversen Transkriptase hergestellt und mit 1,5 µl eingestellter RNA vermischt. Auch das Protokoll im Thermocycler entsprach dem oben beschriebenen zur Herstellung der cDNA.

#### 2.2.9.1 Überprüfung der RT-PCR und des DNase Verdaus

Um das Gelingen der Umschreibung und der kompletten Elimination der genomischen DNA zu überprüfen, wurde eine PCR mit dem Housekeeper  $\beta$ -Aktin (s.Tab.4 S.68) verwendet, da dieses Gen in beiden Genotypen eine gleichbleibend hohe Expression zeigte. Es wurden von jeder Probe jeweils 1 µl cDNA und 1 µl Kontroll-RNA (RT-Mix ohne Reverse Transkriptase) mit 24 µl Mix, der wie folgt hergestellt wurde, gemischt:

15 µl	Steriles Bidest
5 µl	GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer (5xGreen)
2 µl	MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	dNTP Mix
0,5 µl	Primer, vorwärts
0,5 µl	Primer, rückwärts
0,5 µl	GoTaq <sup>®</sup> Flex DNA Polymerase
24 µl	Gesamtvolumen für einen Ansatz.

Das im Thermocycler verwendete Protokoll enthielt folgende Schritte:

2 Minuten	95°C Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge	} x 40
30 Sekunden	95°C Denaturierung der DNA-Doppelstränge	
30 Sekunden	60°C Anlagerung der Primer	
7 Minuten	72°C Amplifikation der DNA	
7 Minuten	72°C Finale Amplifikationsphase	
Unbegrenzt	4°C Kühlung der Produkte	

Die Produkte wurden daraufhin auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt, nach dem unter 2.2.2.3 beschriebenen Verfahren. Es werden folgend nur die Modifikationen beschrieben.

### **Vorarbeiten:**

#### Herstellung von 10xTAE-Puffer pH 8 Stammlösung:

Unter dem Abzug arbeiten.

48,4 g TrisBase

20,0 ml EDTA auf

990 ml mit Aqua bidest auffüllen.

Lösung mit Hilfe eines Magnetrührers mischen.

Mit Hilfe des pH-Meters und Essigsäure wurde der pH auf 8 eingestellt auf

1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt

#### Herstellung von 1xTAE-Puffer pH 8 Gebrauchslösung:

1 Teil TAE-Puffer Stammlösung mit

9 Teile Aqua bidest mischen und dann pH mit Hilfe von Essigsäure bzw. NaOH auf 8 einstellen.

#### Herstellung des Markers:

1 µl PCR 100 bp Low Ladder mit

2 µl 6x DNA Loading Dye und

9 µl Aqua bidest mischen.

Als Modifikation wurde das Gel aus dem 1xTAE-Puffer pH 8, 0,6 g Agarose und 3 µl SYBR<sup>®</sup> GREEN I hergestellt.

Die Produkte der PCR-Reaktion wurden unverdünnt auf das Gel aufgetragen und als Marker der "PCR 100 bp Low Ladder" verwendet.

Es wurden nur Umschreibeprodukte für spätere Reaktionen verwendet, die in der Elektrophorese eine spezifische Bande für das aus der cDNA hergestellte PCR-Produkt und keine Bande für das PCR-Produkt aus der Negativkontrolle zeigten.

#### 2.2.9.2 Aufreinigung der cDNA

Für die Aufreinigung der cDNA wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. In diesem sind alle Puffer und die Säulchen enthalten.

#### **Vorarbeiten:**

##### PE-Puffer-Gebrauchslösung:

24 ml 100%igen Alkohol hinzufügen.

##### PB-Puffer-Gebrauchslösung:

120 µl pH-Indikator I zu  
30 ml PE-Puffer geben.

Der genaue Ablauf war wie folgt:

- a) Zugabe von 5 Volumeneinheiten (500 µl) PB-Puffer zu 1 Volumeneinheit (100 µl) der PCR-Reaktion und mischen.
- b) Platzierung von einem QIAquick -Säulchen in einem 2-ml Sammel tube.
- c) Die Probe wurde auf ein Säulchen geladen um die DNA zu binden und bei 13.000 UpM für 30-60 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss verworfen und das Säulchen wieder in demselben Sammel tube platziert.
- d) Zum Waschen wurden 0,75 ml PE-Puffer auf das Säulchen gegeben und dieses wieder für 30-60 Sekunden bei 13.000 UpM zentrifugiert. Danach erfolgte der Verwurf des Durchflusses und Platzierung des Säulchens wieder in demselben Sammel tube.

- e) Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 UpM. Platzierung des Säulchens in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß.
- f) Zur Lösung der DNA wurden 50 µl EB-Puffer direkt in das Zentrum der Säulchenmembran gegeben und dieses wiederum für 1 Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert.

Die aufgereinigte cDNA wurde bis zu ihrer Nutzung bei -20°C gelagert.

#### 2.2.10 qRT-PCR

Um die Resultate der Microarray-Analyse zu verifizieren, wurde die Methode der qRT-PCR verwendet. Die ausgewählten Gene kamen aus allen Bereichen der Genexpression (von stark herunter- bis stark heraufreguliert). Weiterhin wurden Gene, welche mit der Bildung Blut-Hoden-Schranke assoziiert sind (z.B. Occludin) und/ oder eine Funktion in der Spermatogenese besitzen (z.B. Stra8, Dazl) ausgewählt.

##### 2.2.10.1 Auswahl der Primerpaare für die qRT-PCR

Die Primer wurden mit Hilfe der Biorad Beacon Designer Software ausgesucht und von der Firma Eurofins hergestellt. Vor dem Einsatz in der qRT-PCR wurden sie zunächst in einer klassischen PCR-Reaktion mit anschließender Agarosegelelektrophorese getestet. Dazu wurde dasselbe Protokoll verwendet wie unter Punkt 2.2.9.1 beschrieben. Lediglich die Primer wurden verändert. Nur Primerpaare die zu einer einzelnen, spezifischen Bande führten, wurden in der qRT-PCR weiter genutzt.

##### 2.2.10.2 Erstellung der cDNA-Verdünnungsreihe

Als letzter Test vor dem eigentlichen Genexpressionsvergleich zwischen beiden Genotypen wurde eine qRT-PCR mit einer cDNA-Verdünnungsreihe im CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System durchgeführt. Diese erfüllte zwei Aufgaben: Einerseits konnte durch die in der Amplifikationsphase stattfindende Schmelzkurvenerstellung ein weiteres Mal die Spezifität der Amplifikation kontrolliert und nachgewiesen werden und andererseits die Effizienz der Amplifikation für jedes Primerpaar spezifisch ermittelt werden.

Das genaue Protokoll lautete wie folgt:

Es wurde auf Eis und mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet.

### **Erstellung des Mastermixes:**

Pro Well = Für 18 Wells (+ 2 Pipettierverlust) d.h. x20

10 µl	200 µl	iQ SYBR Green Supermix
0,6 µl	12 µl	Primer, vorwärts
0,6 µl	12 µl	Primer, rückwärts
7,8 µl	156 µl	Steriles Aqua bidest
19 µl	380 µl	Gesamtvolumen

### **Erstellung der cDNA-Verdünnungsreihe:**

Es wurde immer die cDNA einer WT-Maus für die Verdünnungsreihen genutzt.

- Tube 1: 1,8 µl cDNA + 16,2 µl Aqua bidest (1:10) gut mischen.  
Tube 2: 1,8 µl cDNA aus 1 + 16,2 µl steriles Aqua bidest (1:100) gut mischen.  
Tube 3: 1,8 µl cDNA aus 2 + 16,2 µl steriles Aqua bidest (1:1000) gut mischen.  
Tube 4: 1,8 µl cDNA aus 3 + 16,2 µl steriles Aqua bidest (1:10000) gut mischen.

Der Plattenbelegungsplan sah wie folgt aus:

**Tabelle 2: Belegungsschema Verdünnungsreihe.**

unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
1:10	1:10	1:10
1:100	1:100	1:100
1:1000	1:1000	1:1000
1:10000	1:10000	1:10000
NTC	NTC	NTC

Es wurde in jeweils 3 Wells der 96-Well Platte (Low-Profile Multiplate Unskirted PCR Plate, 96 Well) 1 µl cDNA der gleichen Konzentration vorgelegt. Außerdem wurde in drei Wells steriles Aqua bidest als Negativkontrolle (NTC) vorpipettiert (s.Tab.2). Zu cDNA und sterilen Aqua bidest wurden je Well 19 µl des Mastermixes hinzugegeben. Die Platte wurde anschließend mit Hilfe eines Klebefilms (Microseal® 'B' Adhesive Seals) und eines Plastikschabers verschlossen und in den Cyclor verbracht.

Das genaue Amplifikations- und Schmelzkurvenprotokoll beinhaltete:

3 Minuten	95°C	Initiale Auftrennung der DNA-Stränge	
10 Sekunden	95°C	Denaturierung der cDNA	
1 Minute	60°C	Anlagerung der Primer/ Amplifikation	} x40
		Detektion von Fluoreszenz	
10 Sekunden	95°C	Auftrennung der DNA-Stränge	
Je 5 Sekunden mit je 0,5°C Unterschied		Schmelzkurvenerstellung von 65°C bis 95°C	

Zur Detektion und Auswertung wurde die CFX<sup>TM</sup> Manager Software verwendet.

Nur Primerpaare mit einer einzelnen, spezifischen Schmelzkurve und einer aus der Steigung der Amplifikationsgrade errechneten Effizienz von 75 bis 115% wurden für das Experiment genutzt.

### 2.2.10.3 Vergleich der Genexpression in der qRT-PCR

Es wurden je Primerpaar bzw. Gen mindestens drei biologische Replikate angefertigt. Dazu wurden auf jeder 96-Well-Platte je ein WT-Tier und ein SCCx43KO-Tier verglichen. Als Housekeeping-Gene wurden  $\beta$ -Aktin und Hsp90ab1 verwendet, da beide Gene in vorangegangenen Versuchen keine Regulation ihrer der Expression im Vergleich WT- zu SCCx43KO-Tier zeigten. Dies wurde in einer vorrangegangenen Versuchsreihe mit Hilfe von cDNA-Verdünnungsreihen überprüft. Für jedes untersuchte Gen wurden immer Triplikate angefertigt und auch NTC zur Kontrolle mitgeführt. Ein Beispiel für die Belegung einer Platte für den Vergleich der Expression eines Gens ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Belegungsplan für einen Genexpressionsvergleich.**

WT β-Aktin	WT β-Aktin	WT β-Aktin	WT Hsp90ab1	WT Hsp90ab1	WT Hsp90ab1	WT Gen X	WT Gen X	WT Gen X
SCCx43KO β-Aktin	SCCx43KO β-Aktin	SCCx43KO β-Aktin	SCCx43KO Hsp90ab1	SCCx43KO Hsp90ab1	SCCx43KO Hsp90ab1	SCCx43KO Gen X	SCCx43KO Gen X	SCCx43KO Gen X
NTC β-Aktin	NTC β-Aktin	NTC β-Aktin	NTC Hsp90ab1	NTC Hsp90ab1	NTC Hsp90ab1	NTC Gen X	NTC Gen X	NTC Gen X

Das genaue Protokoll lautete wie folgt:

Es wurde auf Eis und mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet. Die Mengen der Reagenzien blieben für jedes Gen gleich, lediglich die Vorwärts- und Rückwärts-Primer waren verschieden (s.Tab.4).

**Tabelle 4: In der qRT-PCR verwendete Primersequenzen.**

Zielgen	Primer vorwärts	Primer rückwärts
β-Aktin	5'TTCCTTCTTGGGCATGGAGT3'	5'TACAGGTCTTTGCGGATGTC3'
Hsp90ab1	5'AAGAGAGCAAGGCAAAGTTTGAG3'	5'TGGTCACAATGCAGCAAGGT3'
Dgkz	5'CCTGGAGGTCATCGGCTTCAC3'	5'TCTCGGCACTGCGTCAATCG3'
Kif17	5'ACTCCTCCCGTTCCCACTCC3'	5'GCCAGGTCTACCAGGTTGAGC3'
Stra8	5'CGCCTTCGCAGACCTCACC3'	5'GCTCGCTCCCTGGCTGTC3'
Sox3	5'GCCCTGGAGAACCCCAAGATG3'	5'ACCGCACGCAGTCGCTTG3'
Tex11	5'CATCTCTGTGCGTCTTACGTTGC3'	5'ATTCCGCTTGCTTGCTTCTATGC3'
Syp2	5'GGCTGACCCATCGTGGACAG3'	5'ACACCCGCAGACACTTTAGGC3'
Dmrt6	5'CGACTACGGGCATCCTCTGAG3'	5'GACGCAGGCAGGGCACTG3'
Sohlh1	5'CAGGAGGCGGATCTCGTTGAG3'	5'ATGCTGTGGGCAAGCTGGAG3'
Rxfp2	5'TCCGTGGGCGTCTTTGACATC3'	5'GCAGCAGCACCGAGACCTC3'
Zo1a-	5'CGACAAATGCGGTTGATC3'	5'TTACACCTTGCTTAGAGTGAGGGTT3'
Zo1a+	5'CCCTACCAACCTCGGCCTT3'	5'AACGCTGGAAATAACCTCGTTC3'
Occludin	5'ATCCTGTCTATGCTCATTATTGTG3'	5'CTGCTCTTGGGTCTGTATATCC3'
Cldn11	5'CGTCATGGCCACTGGTCTCT3'	5'GGCTCTACAAGCCTGCACGTA3'
Cdh2	5'TGGCAATCAAGTGGAGAACC3'	5'ATCCGCATCAATGGCAGTG3'
Cdkn2a	5'TGGTGAAGTTCGTGCGATCCC	5'GGTGCGGCCCTCTTCTCAAG3'
Dazl	5'GGAGGCCAGCACTCAGTCTTC	5'AGCCCTTCGACACACCAGTTC3'
Gja1	5'ACAGCGGTTGAGTCAGCTTG	5'GAGAGATGGGGAAGGACTTGT3'
Amh	5'CCAACGACTCCCGCAGCTC	5'CTTCCCGCCCATGCCACTC3'



Zielgen	Primer vorwärts	Primer rückwärts
<b>Ddx25</b>	5'CTGCCAGACACGTCGAAATGC	5'TCGCTGCTCCACTGTGAGTTC3'
<b>Piwi2</b>	5'CAGAAGACTCCAGCCCACCAC	5'TCAAGACCCATGCCACGGAAC3'

#### Erstellung des Mastermixes für das jeweilige Zielgen:

Pro Well	Für 9 Wells (+2 Pipettierverlust) d.h. x11	
10 µl	110 µl	iQ SYBR Green Supermix
0,6 µl	6,6 µl	Primer, vorwärts (10 pmol/µl)
0,6 µl	6,6 µl	Primer, rückwärts (10 pmol/µl)
7,8 µl	85,8 µl	Steriles Aqua bidest
19 µl	380 µl	Gesamtvolumen

Nach der Herstellung des Mastermixes wurde nach dem Pipettierplan zunächst 1 µl cDNA bzw. steriles Aqua bidest vorgelegt und dann 19 µl Mastermix hinzugefügt. Der Verschluss der Platte geschah wieder mit Hilfe eines Plastikschiebers und Microseal® 'B' Adhesive Seal. Das Thermocyclerprotokoll für die Amplifikation war dasselbe wie für die cDNA-Verdünnungsreihe (s.S.67). Auch die Auswertung wurde wieder mit der CFX<sup>TM</sup> Manager Software unter Nutzung der  $\Delta\Delta C(t)$ -Methode durchgeführt. Insgesamt wurden 20 verschiedene Gene (exklusive der Housekeeping-Gene  $\beta$ -Aktin und Hsp90ab1) in der qRT-PCR untersucht (s.Tab.4).

#### 2.2.10.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Eine repräsentative Anzahl der Gene, die zuvor gezeigt hatten, dass sie eine einzelne, spezifische Bande zeigten, wurden der Sequenzierung zugeführt. Hierzu wurden die PCR-Produkte, wie unter Punkt 2.2.2.3.1 und 2.2.2.3.3 für die Genotypisierung beschrieben, auf ein 2%iges Agarose-Gel verbracht, jedoch mit dem Unterschied, dass anstatt des GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain Detektionssystems, 6 µl Ethidium Bromid eingesetzt wurden. Die Extraktion der DNA aus dem Gel geschah mit Hilfe des GeneJET<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit nach folgendem Protokoll:

- a) Unter schwachem UV-Licht wurde mit Hilfe einer sterilen Skalpellklinge und Pinzette die Bande aus dem Gel ausgeschnitten, in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und gewogen.
- b) Dem Gelstück wurde ein, seinem Gewicht entsprechendes Volumen Binding Buffer (im Kit enthalten) hinzugegeben.
- c) Die Gel-Puffer-Mischung inkubierte daraufhin für 10 Minuten in einem 50-60°C warmen Wasserbad, bis zur völligen Auflösung des Gels.
- d) Die Mischung aus dem Reaktionsgefäß wurde auf eine GeneJET™ Purification Column (im Kit enthalten) gegeben. Zentrifugation für 1 Minute bei 12.000 UpM und Verwurf des Durchflusses.
- e) Nachdem das Säulchen wieder in demselben Sammel tube platziert wurde, wurden 100 µl Bindungspuffer (im Kit enthalten) auf die Säulchenmembran pipettiert, dann wurde dieses für 1 Minute bei 12.000 UpM zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
- f) Platzierung des Säulchens wieder in demselben Sammel tube. Zugabe von 700 µl Waschpuffer (im Kit Enthalten) auf die Säulchenmembran und Zentrifugation für eine Minute bei 12.000 UpM. Verwurf des Durchflusses.
- g) Zentrifugation des Säulchens für eine weitere Minute, um des Rest des Waschpuffers zu entfernen.
- h) Umsetzung des Säulchens in ein frisches 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß und Zugabe von 50 µl Elutionspuffer (im Kit enthalten) in die Mitte der Membran und Zentrifugation bei 12.000 UpM.
- i) Verwurf des Säulchens. Das nun in dem Sammel tube befindliche aufgereinigte PCR-Produkt konnte bei -20°C gelagert werden.

Für die Sequenzierung wurde das Produkt in dem Mikroreaktionsgefäß belassen, mit PARAFILM® verschlossen und an die Firma SRD GmbH (Bad Homburg) versendet.

#### 2.2.10.5 Statistische Auswertung der qRT-PCR-Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Herrn Dr. Klaus Failing, AG Biomathematik und Datenverarbeitung, Justus-Liebig-Universität Gießen, unter Zuhilfenahme der Software „BMDP Statistical Software Package“ (BMDP3D). Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe eines Einstichproben t-Testes

durchgeführt, wobei die Daten zuvor teilweise logarithmiert wurden, wenn keine Normalverteilung vorlag.

Es wurde jeweils der arithmetische Mittelwert der biologischen Replikate bestimmt und die dazugehörige Standardabweichung. Da einige Gene (Stra8, Dmrt6, Sox3, Dazl, Piwil2, Sycp2, Rxfp2, Sohlh1, Cdh2, Zo1a+ und Zo1a-) eine rechtsschiefe Verteilung zeigten, wurden diese Daten logarithmiert und nach der Durchführung des t-Testes wieder endlogarithmiert. Es wurde daher für diese Gene der geometrische Mittelwert und der einfache Streufaktor berechnet. Des Weiteren wurde der p-Wert bestimmt, wobei Expressionsveränderungen mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant und welche mit einem p-Wert  $\leq 0,056$  als „statistisch auffällig“ gewertet wurden.

Bei einem Teil der untersuchten Gene (Amh, Stra8, Dmrt6, Dazl) wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt, da nach der Microarray-Analyse bzw. vorrangigen Studien (Weider et al. 2011) davon ausgegangen werden konnte, dass die Werte hoch- bzw. herunterreguliert sein würden.

#### 2.2.11 Bestimmung der Korrelation zwischen Microarray-Daten und qRT-PCR-Ergebnissen

Um die Korrelation zwischen Werten der Genexpressionsveränderung der Microarray-Analyse und der qRT-PCR bestimmen zu können, wurden von beiden Versuchsergebnissen die FC-Werte bestimmt.

Die Formel zur Errechnung des FC-Wertes war:

$$FC = \frac{\text{SCCx43KO-Maus Genexpressionswert}}{\text{WT-Maus Genexpressionswert}}$$

Bei einem Wert von  $< 1$  wurde der negative, reziproke Wert aufgeführt:

$$FC = - \frac{\text{WT-Maus Genexpressionswert}}{\text{SCCx43KO-Maus Genexpressionswert}}$$

Der Korrelationskoeffizient wurde nach Eingabe der FC-Werte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007 bestimmt.

## 2.2.12 IHC zur Bestätigung der Ergebnisse der Microarray-Analyse und qRT-PCR

Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper ist in Tabelle 5 (s.S.77) dargestellt.

### 2.2.12.1 Cx43-IHC

Die Immunfärbung mit dem gegen Cx43 gerichteten Antikörper (#3512, New England Biolabs GmbH, Frankfurt) diente dem Beweis, dass in den SZ der KO-Tiere kein Cx43-Protein mehr gebildet wird. In dem folgenden Protokoll sind nur die Modifikationen und Veränderungen im Vergleich zu der  $\beta$ -Galaktosidase-Immunfärbung aufgeführt.

#### **Vorarbeiten:**

##### Herstellung von Citratpufferstammlösung

Stammlösung A:

21,01g  $C_2H_8O_7 \times H_2O$  (Zitronensäure) in 1 l Aqua bidest auflösen.

Stammlösung B:

29,41g  $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$  (Natriumcitrat) in 1 l Aqua bidest auflösen.

##### Herstellung von Citratpuffergebrauchslösung

41 ml Stammlösung A mit 7 ml Stammlösung B mischen und auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen.

##### Herstellung von Peroxidase Substrat Kit AEC -Gebrauchslösung

Das AEC-Färbesubstrat wurde erst kurz vor dem Gebrauch frisch angesetzt. Dabei wurde mit Handschuhen unter dem Abzug gearbeitet.

300  $\mu$ l Substratpuffer (aus dem Kit) mit 1 Tropfen AEC-Lösung vermischen.

b) Hitzeinduzierte Demaskierung der Antikörperbindungsstellen

Die OT wurden in einen Küvettenhalter verbracht, der in einem mit Citratpuffergebräuchslösung gefülltem Becherglas stand.

In der Mikrowelle wurde der Citratpuffer samt OT bei 800 Watt zum Kochen gebracht, dann wurde die Wattzahl auf 465 reduziert und noch einmal 15 Minuten lang der Puffer erhitzt.

Zum Abkühlen wurde das Becherglas mit OT für mindestens 20 Minuten in ein Gefäß mit kaltem Leitungswasser verbracht.

Es folgte ein Waschschrift von 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler.

e) Inkubation mit primärem Antikörper

Die OT wurden um die Schnitte herum trocken gewischt und die Schnitte mit dem Dako-Pen umzeichnet, was ein Verlaufen der danach aufgetragenen Flüssigkeit verhinderte. Auf einen Schnitt wurden 50 µl des primären Cx43-Antikörpers (1:100 mit BSA-Blockpuffer verdünnt) pipettiert, der andere Schnitt diente als Negativkontrolle und wurde mit 50 µl Blockpuffer bedeckt. Es wurde über Nacht in der Inkubationskammer im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

f) Inkubation mit sekundärem Antikörper

Primären Antikörper auf Papier abkippen und OT in Küvette mit Waschpuffer einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:200 mit BSA-Blockpuffer verdünnt) aufbringen. Dann 60 Minuten in der Inkubationskammer bei RT inkubieren lassen.

h) Farbreaktion

ABC-Lösung auf Papier abkippen und OT wieder in Küvette einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT wieder um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl AEC-Färbesubstrat aufbringen; etwa 10 Minuten einwirken lassen und dabei regelmäßig das Färbeergebnis unter dem Mikroskop beobachten.

Mit Aqua dest abspülen und in Küvette mit Aqua dest stellen.

3 x 3 Minuten in Aqua dest auf dem Rüttler waschen.

#### 2.2.12.2 Occludin-IHC

Zum Nachweis des Tight junction- und Blut-Hoden-Schranken-Proteins Occludin wurde ein Occludin-Antikörper (#71-1500, Zymed Laboratories Inc., San Francisco) als Primärantikörper verwendet. Das Protokoll entsprach weitgehend dem für Cx43. Es werden folgend nur die Veränderungen zu diesem Versuchsaufbau beschrieben.

##### e) Inkubation mit primärem Antikörper

Die OT wurden um die Schnitte herum trocken gewischt und die Schnitte mit dem Dako-Pen umzeichnet. Je auf einen Schnitt 50 µl des primären Occludin-Antikörpers (1:500 in BSA-Blockpuffer verdünnt) pipettieren, der andere Schnitt diente als Negativkontrolle und wurde mit 50 µl Blockpuffer bedeckt. Über Nacht in der Inkubationskammer im Kühlschrank bei 4°C inkubieren.

##### f) Inkubation mit sekundärem Antikörper

Primären Antikörper auf Papier abkippen und OT in Küvette mit Waschpuffer einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:200 verdünnt mit BSA-Blockpuffer) aufbringen; dann 60 Minuten in der Inkubationskammer bei RT inkubieren lassen.

##### a) Gegenfärben

Es wurde keine Gegenfärbung durchgeführt.

### 2.2.12.3 Amh-IHC

Um die Expression des Anti-Müller-Hormons (Amh) nachzuweisen wurde ein MIS-Antikörper (Müllerian inhibiting substance) (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) als Primärantikörper verwendet. Es werden folgend nur die Abweichungen vom  $\beta$ -Galaktosidase-IHC-Protokoll dargestellt.

#### e) Inkubation mit primärem Antikörper

Die OT wurden um die Schnitte herum trocken gewischt und die Schnitte mit dem Dako-Pen umzeichnet. Je auf einen Schnitt wurden 50  $\mu$ l des primären Amh-Antikörpers (1:50 in BSA-Blockpuffer verdünnt) pipettiert, der andere Schnitt diente als Negativkontrolle und wurde mit 50  $\mu$ l Blockpuffer bedeckt. Inkubation über Nacht in der Inkubationskammer im Kühlschrank bei 4°C.

#### f) Inkubation mit sekundärem Antikörper

Primären Antikörper auf Papier abkippen und OT in Küvette mit Waschpuffer einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT um Präparate herum trocken wischen und auf beide Schnitte jedes OT 50  $\mu$ l biotinylierten Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper (1:200 in BSA-Blockpuffer verdünnt) aufbringen. Dann 60 Minuten in der Inkubationskammer bei RT inkubieren lassen.

### 2.2.12.4 Stra8-IHC

Zum Nachweis des Stra8-Antigens diente der von der Arbeitsgruppe Griswold (School of Molecular Biosciences, Washington State University, Pullman, USA). bereitgestellte Kaninchen-anti-Stra8-Antikörper (Zhou et al. 2008). Das Protokoll entsprach weitgehend dem für Cx43. Es werden folgend nur die Veränderungen zu diesem Versuchsaufbau beschrieben.

e) Inkubation mit primärem Antikörper

Die OT wurden um die Schnitte herum trocken gewischt und die Schnitte mit dem Dako-Pen umzeichnet. Je auf einen Schnitt 50 µl des primären Stra8-Antikörpers (1:250 in BSA-Blockpuffer verdünnt) pipettieren. Der andere Schnitt diente als Negativkontrolle und wurde mit 50 µl Blockpuffer bedeckt. Über Nacht in der Inkubationskammer im Kühlschrank bei 4°C inkubieren.

f) Inkubation mit sekundärem Antikörper

Primären Antikörper auf Papier abkippen und OT in Küvette mit Waschpuffer einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:300 in BSA-Blockpuffer verdünnt) aufbringen; dann 60 Minuten in der Inkubationskammer bei RT inkubieren lassen.

#### 2.2.12.5 Dazl-IHC

Für diese Immunreaktion wurde der Maus-anti-Dazl-Antikörper (MCA2336, AbD Serotec, Düsseldorf) verwendet. Das Protokoll entsprach weitgehend dem für Cx43. Es werden folgend nur die Veränderungen zu diesem Versuchsaufbau beschrieben.

e) Inkubation mit primärem Antikörper

Je auf einen Schnitt 50 µl des primären Dazl-Antikörpers (1:250 in BSA-Blockpuffer verdünnt) pipettieren. Der andere Schnitt diente als Negativkontrolle und wurde mit 50 µl Blockpuffer bedeckt. Über Nacht Inkubation in der Inkubationskammer im Kühlschrank bei 4°C.

f) Inkubation mit sekundärem Antikörper

Primären Antikörper auf Papier abkippen und OT in Küvette mit Waschpuffer einsortieren.  
3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.



OT um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl biotinylierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper (1:300 in BSA-Blockpuffer verdünnt) aufbringen. Dann 60 Minuten in der Inkubationskammer bei RT inkubieren lassen

Eine Übersicht über die durchgeführten IHC ist in Tabelle 5 dargestellt:

**Tabelle 5: Durchgeführte IHC.**

	<b>β-Galakto- sidase</b>	<b>Cx43</b>	<b>Amh</b>	<b>Stra8</b>	<b>Dazl</b>	<b>Occludin</b>
<b>Vorbehand- lung</b>	nein	ja	nein	ja	Ja	ja
<b>Host</b>	Kaninchen	Kaninchen	Ziege	Kaninchen	Maus	Kaninchen
<b>Art des primären Antikörpers und seine Verdünnung</b>	Anti- β-Galakto- sidase  1:1000	Anti-Cx43  1:100	Anti-Amh  1:50	Anti-Stra8  1:250	Anti-Dazl  1:250	Anti- Occludin  1:500
<b>Host</b>	Ziege	Ziege	Kaninchen	Ziege	Ziege	Ziege
<b>Art des sekundären Antikörpers und seine Verdünnung</b>	Anti- Kaninchen biotinyliert  1:400	Anti- Kaninchen biotinyliert  1:200	Anti- Ziege biotinyliert  1:200	Anti- Kaninchen biotinyliert  1:300	Anti- Maus biotinyliert  1:300	Anti- Kaninchen biotinyliert  1:200
<b>Detektionssystem ABC</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Färbesubstrat</b>	DAB	AEC	DAB	AEC	AEC	AEC

#### 2.2.12.6 Lichtmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion

Die Auswertung der verschiedenen Färbungen und Immunreaktionen wurde am Lichtmikroskop Axiophot vorgenommen. Für die Abbildungen im Ergebnisteil wurde das Axiophot mit folgenden Objektiven verwendet: PLAN-Neofluar 40x und Plan-Apochromat 20x. Die Bildaufnahme und Archivierung wurde mit Hilfe der analySIS<sup>®</sup> Software durchgeführt.

#### 2.2.13 IF

##### 2.2.13.1 Allgemeine Vorbemerkungen zur IF

Ähnlich wie bei der IHC wird bei der IF mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ein bestimmtes Antigen nachgewiesen. Auch hier kann mit der indirekten Methode gearbeitet werden und mit Hilfe eines sekundären Antikörpers der den Fluoreszenzfarbstoff trägt, der primäre Antikörper, der gegen das gewünschte Epitop gerichtet ist, nachgewiesen werden. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Methoden ist, dass nicht eine unter dem Lichtmikroskop sichtbare Farbreaktion am Ende steht, sondern ein Fluoreszenzmikroskop notwendig ist, um das entsprechende Fluorochrom sichtbar zu machen. Bei dem Fluoreszenzmikroskop wird mit Hilfe einer Lichtquelle ein möglichst großer Bereich von Anregungswellenlängen produziert. Diese fallen durch einen Anregungsfilter, der eine einzelne Wellenlänge isoliert und auf den Farbverteiler, der das kurzwellige Anregungslicht reflektiert. Das durch die so angeregten Fluorochrome abgestrahlte, langwellige Licht kann ihn jedoch passieren. Das Licht, welches den Farbverteiler passiert hat, wird durch einen Sperrfilter noch weiter gefiltert, so dass am Ende ein lichtschwaches aber spezifisches Signal sichtbar wird.

##### 2.2.13.2 IF von Dmrt7

Die Immunfluoreszenz wurde mit einem von der Arbeitsgruppe Zarkower (Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota, Minneapolis, USA) freundlicherweise bereitgestellten Kaninchen-Anti-Dmrt7-Antikörper (Kim et al. 2007b) durchgeführt.

Das genaue Protokoll lautete wie folgt:

a) Deparaffinieren und Rehydrieren:

OT in Küvettenhalter einsortieren

3x 10 Minuten Xylol

1x 5 Minuten Ethanol 100%

1x 5 Minuten Ethanol 96%

1x 5 Minuten Ethanol 70%

1x 5 Minuten Ethanol 50%

1x 5 Minuten Aqua dest

b) Hitzeinduzierte Demaskierung der Antikörperbindungsstellen

Die hitzeinduzierte Demaskierung wurde wie für Cx43 beschrieben durchgeführt.

c) Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen

BSA-Blockpuffer mit 5%igem Ziegenserum 60 Minuten auf dem Rüttler bei RT.

d) Inkubation mit primärem Antikörper

OT trocknen, Präparate mit Dako Pen umzeichnen und in Inkubationskammer, die mit feuchten Tüchern ausgelegt ist, legen.

Pro Schnitt 50 µl des primären Dmrt7-Antikörpers (1:200 in BSA-Blockpuffer mit 5% Ziegenserum verdünnt) pipettieren. Der andere Schnitt diente als Negativkontrolle und wurde mit 50 µl Blockpuffer bedeckt. Es wurde über Nacht in der Inkubationskammer bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

e) Inkubation mit sekundärem Antikörper

Primären Antikörper auf Papier abkippen und OT in Küvette mit Waschpuffer einsortieren.

3 x 3 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

OT um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:300 in BSA-Blockpuffer verdünnt) aufbringen. Dann 60 Minuten in Inkubationskammer bei RT inkubieren lassen.

f) Inkubation mit NeutrAvidin Dylight

Sekundären Antikörper auf Papier abkippen und OT wieder in Küvette einsortieren.

4 x 5 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

Alle folgenden Schritte wurden im abgedunkelten Raum durchgeführt. Der Küvettenhalter mit den OT wurde zusätzlich mit Alufolie umwickelt, um eine Lichteinwirkung zu verhindern.

OT um Präparate herum trocken wischen und dann auf beide Schnitte jedes OT 50 µl NeutrAvidin Dylight 488 in der Verdünnung 1:200 (in BSA-Blockpuffer verdünnt) für 60 Minuten bei RT in dunkler Inkubationskammer einwirken lassen.

g) Waschen und Eindecken

4 x 5 Minuten in Waschpuffer auf dem Rüttler waschen.

Die OT aus der Küvette nehmen, um Präparate herum trocken wischen, je Präparat 1 Tropfen Aqua Polymouth aufbringen und ein Deckgläschen festdrücken. Die Schnitte wurden feucht, dunkel und kühl bis zur Fluoreszenzmikroskopie nach zwei Tagen aufbewahrt.

### 2.2.13.3 Detektion des IF-Signals und Auswertung der Immunreaktion

Zur Detektion des Immunfluoreszenzsignals wurde das Axio Observer verwendet. Die Beurteilung und Bearbeitung erfolgte mit der AxioVision Rel.4.7.2 Software.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genotypisierungen

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden ausschließlich Hoden von acht und 15 Tage alten KO- und WT-Mäusen verwendet, die folgende Kriterien erfüllten:

- a) In der Genotypisierung mittels PCR als homozygot gefloxed ermittelt wurden;
- b) In der  $\beta$ -Galaktosidase-IHC eine dem Genotyp entsprechende (Cre positiv oder negativ) Färbung der SZ zeigten bzw. nicht zeigten.

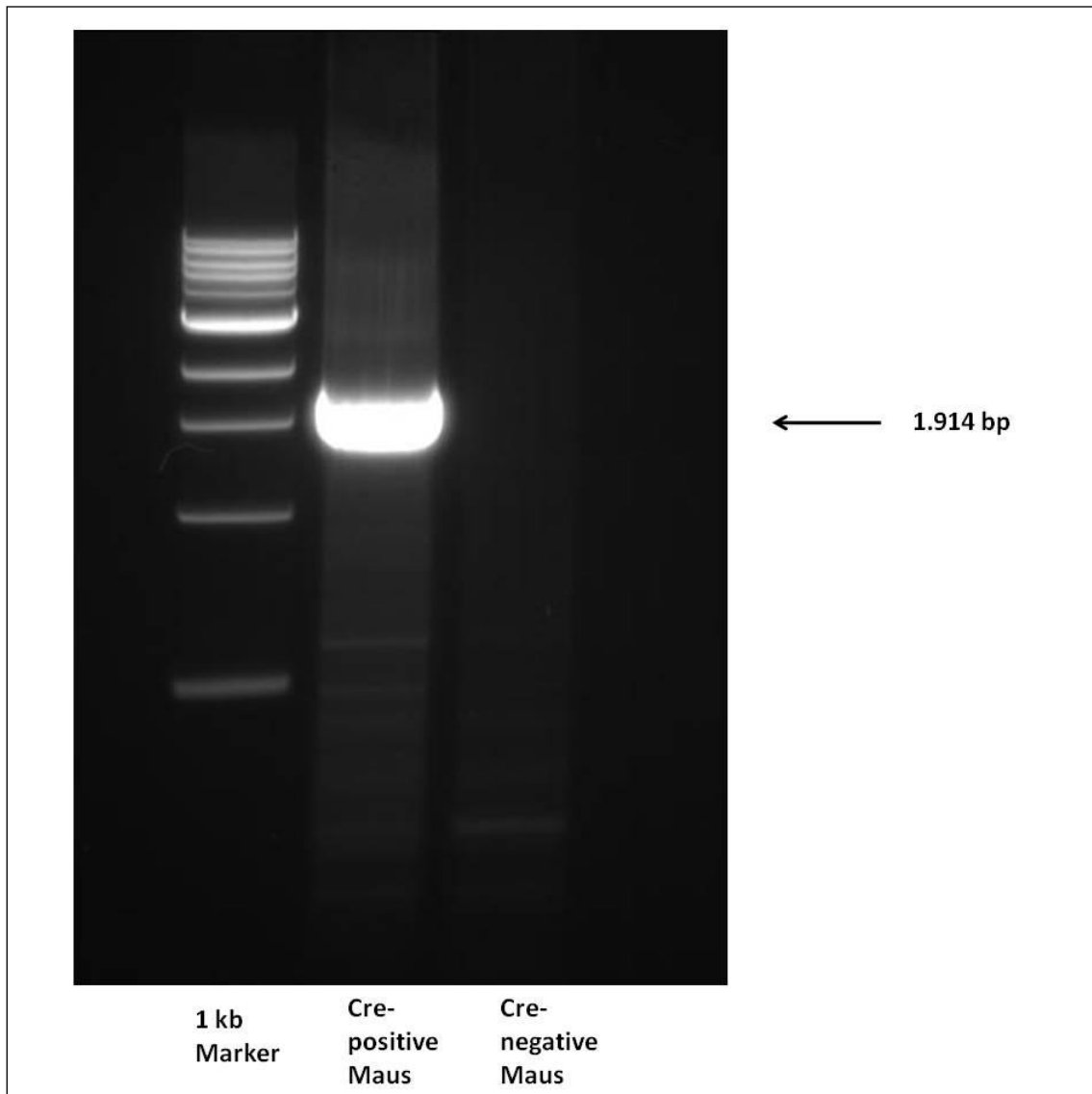
Zusätzlich wurde in der histologischen Evaluation von HE-gefärbten Präparaten durch Auszählen der KZ der Genotyp aus der PCR bestätigt.

##### 3.1.1 PCR

Mittels der aus den Schwanzbiopsien gewonnenen DNA wurde eine PCR zur Detektion der Cre-Rekombinase und eine weitere zur Bestimmung des „Flox-Merkmals“, mit anschließender Agarosegelelektrophorese und Dokumentation, durchgeführt.

##### 3.1.1.1 Cre-PCR

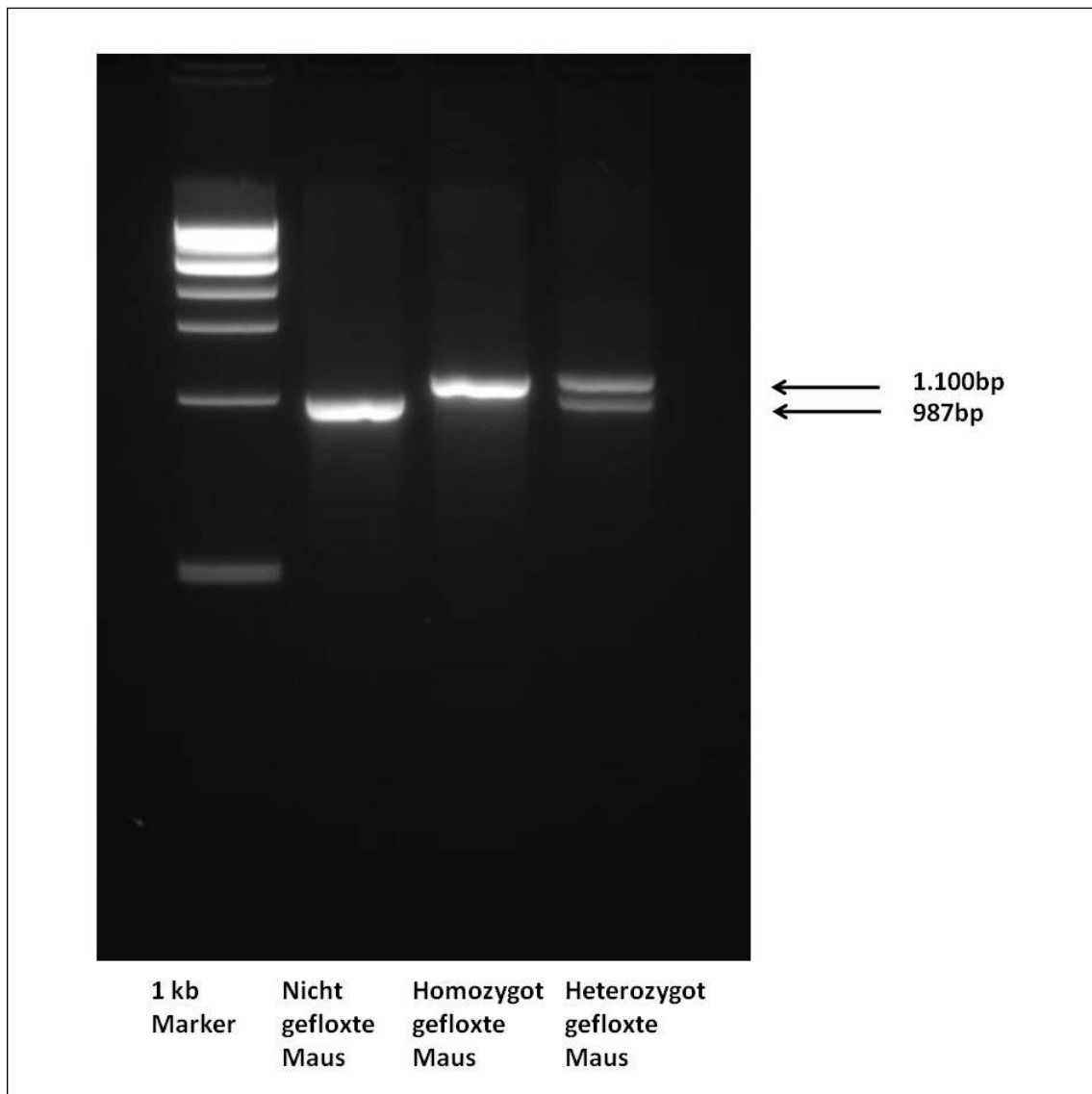
Es wurde je Versuch immer eine Positivkontrolle für die Cre-PCR mit prozessiert. Dazu wurde eine Maus genutzt, die in der vorangegangenen Genotypisierung als Cre-Träger identifiziert wurde und deren Phänotyp und  $\beta$ -Galaktosidase-IHC den Genotyp bereits bestätigt hatten. Alle als SCCx43KO-Mäuse bezeichneten Tiere wiesen dieses spezifische PCR-Produkt auf, während bei den WT-Tieren keine Bande detektierbar war. Die Cre-PCR ergab eine Bande bei 1.914 bp (s.Abb.19).



**Abbildung 19: Repräsentatives Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese der Cre-PCR-Produkte. Bei der Maus, die die Cre-Rekombinase in das Genom eingebaut hat, zeigt sich eine deutliche Bande bei 1.914 bp. Dagegen ist bei dem Cre-negativen Tier kein PCR-Produkt erkennbar.**

### 3.1.1.2 Flox-PCR

In dieser PCR-Reaktion wird beurteilt, ob es sich bei der untersuchten Maus um ein Tier handelt, bei dem ein, beide oder kein Cx43-Allel mit LoxP-Elementen flankiert ist. Nur mit den LoxP-Elementen flankierte, „gefloxt“ Gene werden von der Cre-Rekombinase erkannt und können aus dem Genom entfernt werden. Bei den in diesen Versuchen genutzten Mäusen

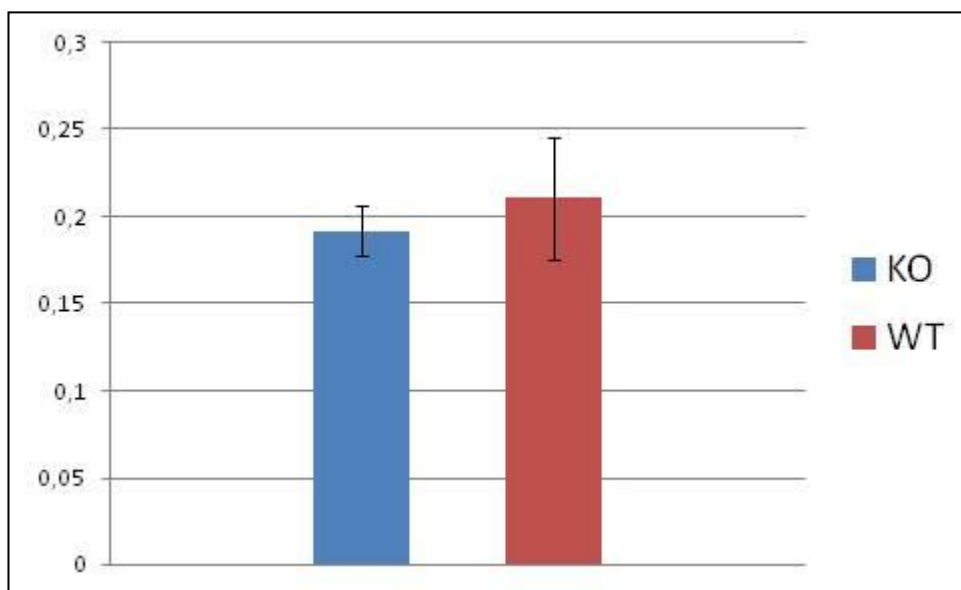


**Abbildung 20: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der Flox-PCR-Produkte. Die WT- und SCCx43KO-Maus zeigen jeweils eine Bande mit einer Produktlänge von 987 bp bzw. 1.100 bp. Das heterozygote Tier hingegen bringt beide Banden in Kombination hervor.**

handelt es sich ausschließlich um homozygot gefloxt Tiere, d.h. sie weisen entsprechend ihrer Verpaarung (F2) eine spezifische Bande bei 1.100 bp auf. Es wurde bei allen Versuchen eine heterozygot gefloxt Maus als Kontrolle mitgeführt (s.Abb.20).

### 3.2 Bestimmung des relativen Hodengewichtes

Nach der Euthanasie der Tiere wurden diese gewogen und der Hoden entnommen. Anschließend wurde das Gewicht der Hoden bestimmt und das relative Gewicht errechnet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und SCCx43KO-Mäusen (s.Abb.21).



**Abbildung 21: Relatives Hodengewicht.**

Der prozentuale Anteil der beiden Hoden am Gesamtgewicht betrug bei den WT-Mäusen 0,2108 und bei den SCCx43KO-Tieren 0,192. Der schwarze Balken stellt die Standardabweichung dar (WT:0,034; SCCx43KO:0,014). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

### 3.3 Evaluation von HE gefärbten Schnitten

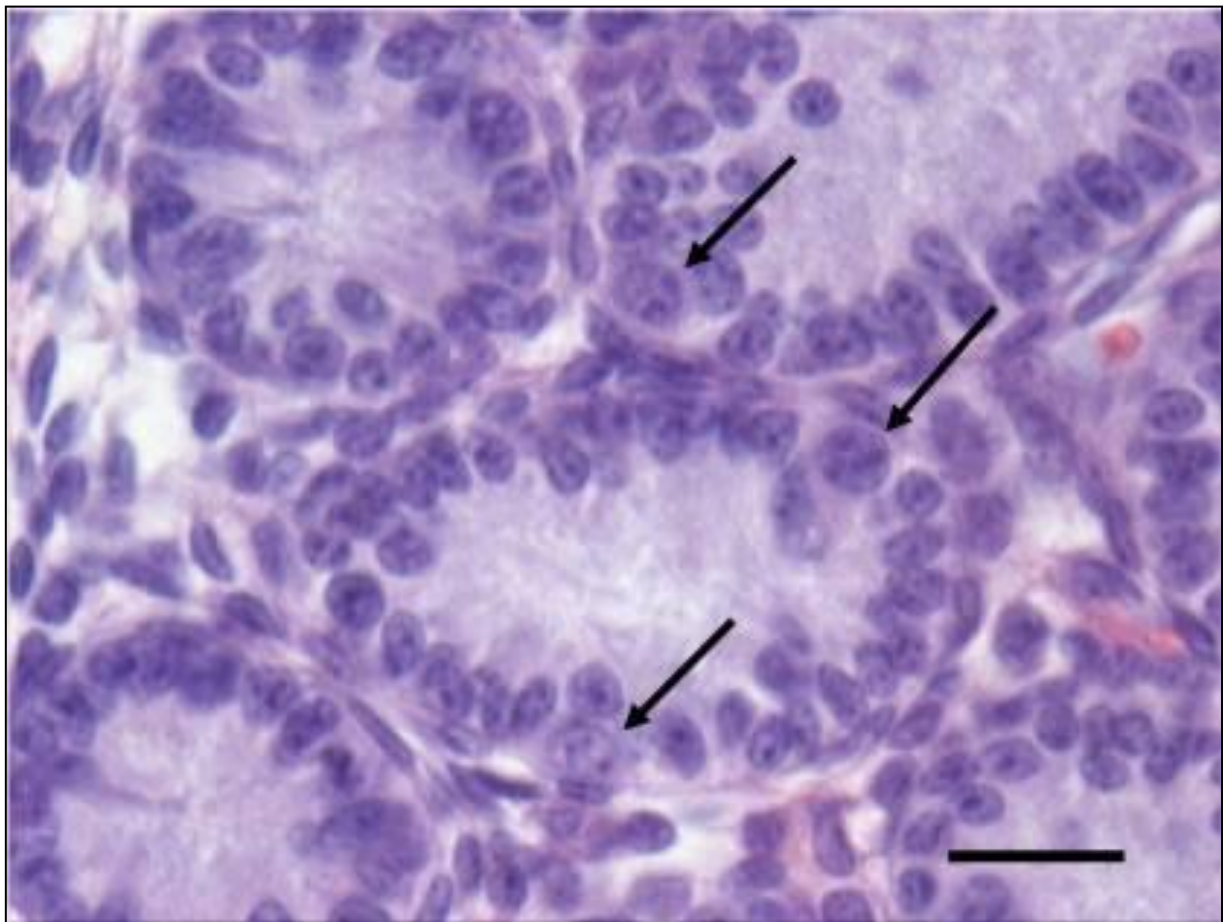
Um den durch die PCR bestimmten Genotyp ein weiteres Mal zu kontrollieren und um die zwei Genotypen an Tag acht nach der Geburt morphologisch zu vergleichen, wurden von jeder verwendeten Maus HE-gefärbte Schnitte ausgewertet. Schon an Tag acht nach der



Geburt sind morphologische Unterschiede zwischen WT- und SCCx43KO-Mäusen zu erkennen (s.Abb.22 und 23).

### 3.3.1 WT-Mäuse

In den Keimsträngen erkennt man überwiegend SZ, denen zu diesem Entwicklungszeitpunkt eine deutlich geringere Anzahl von KZ gegenübersteht (s.Abb.22).

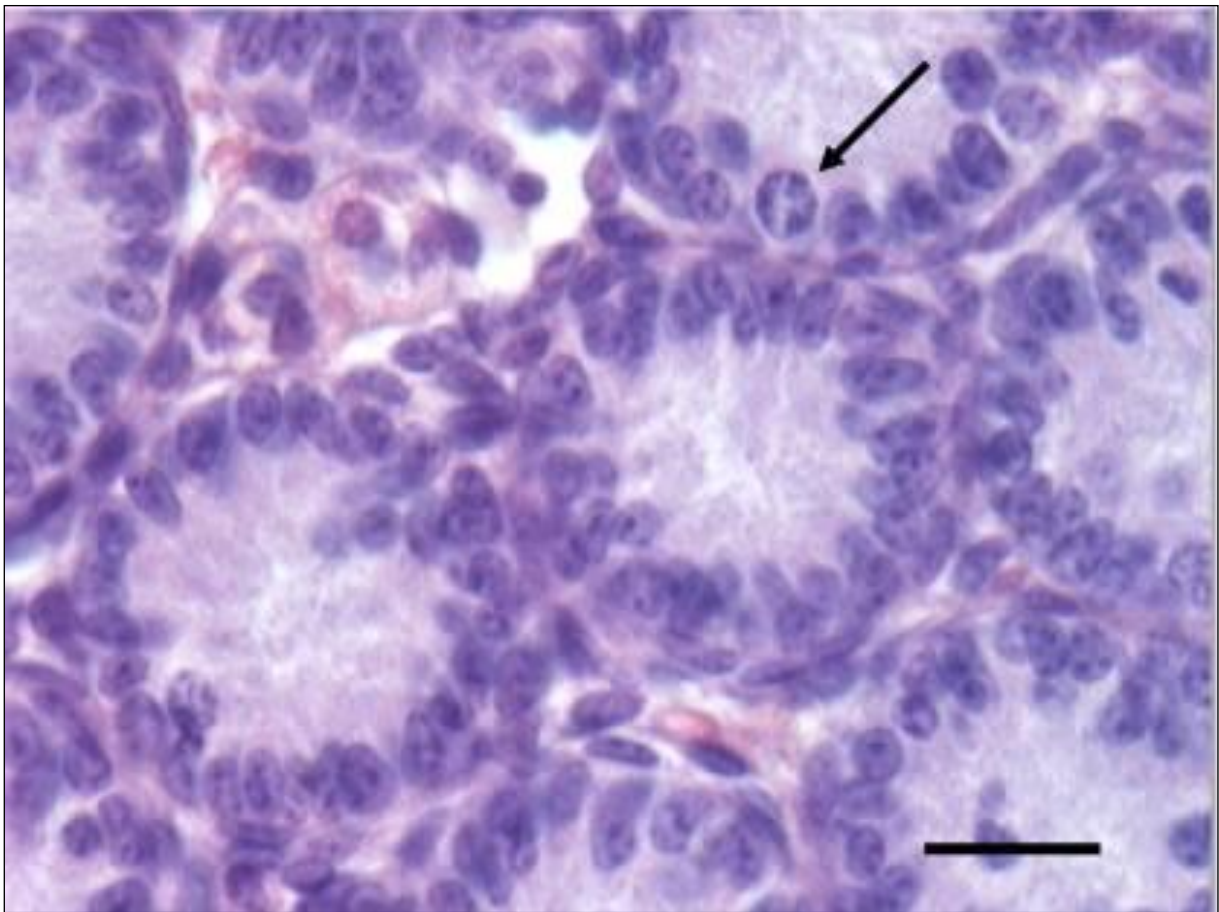


**Abbildung 22: Repräsentative HE-Färbung einer acht Tage alten WT-Maus.**

**Die Pfeile markieren exemplarisch KZ, die sich morphologisch deutlich von den SZ unterscheiden. Der Meßbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .**

### 3.3.2 SCCx43KO-Mäuse

Im Vergleich zur WT-Maus, sind nur sehr vereinzelt KZ in den Tubuli auffindbar. Die Morphologie und Anzahl von SZ, peritubulären Zellen und Leydigzellen erscheint in diesem Alter und in diesem Genotyp unverändert im Vergleich zum gleichaltrigen WT (s.Abb.23).



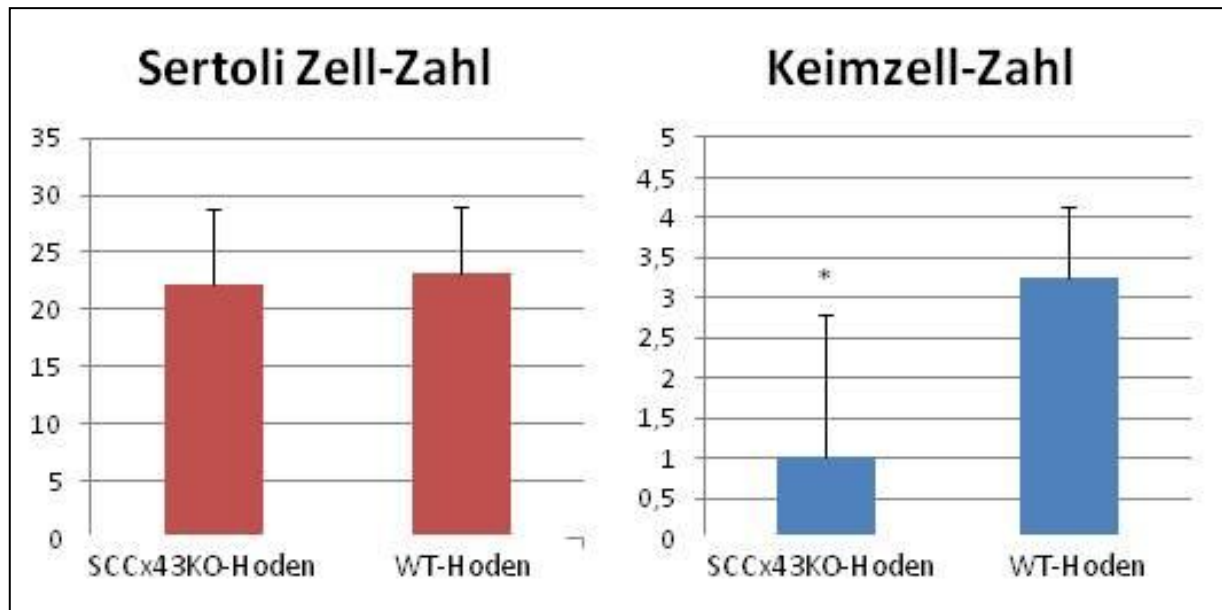
**Abbildung 23: Repräsentativer HE-gefärbter Schnitt einer acht Tage alten SCCx43KO-Maus. Der Pfeil deutet exemplarisch auf eine der wenigen KZ. Der Meßbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .**

### 3.4 Morphometrische Bestimmung der SZ- und KZ-Zahl

Um die möglichen Unterschiede in der Zellzusammensetzung der Keimtubuli an Tag acht p.p. zu quantifizieren und um mögliche Veränderungen in der Genexpression um diese korrigieren zu können, wurden die SZ und KZ pro Keimtubulus ausgezählt.

Hierzu wurden in HE-gefärbten Schnitten von den WT- und den SCCx43KO-Mäusen, die auch später für die Microarray-Studie verwendet wurden, die Anzahl von KZ- und SZ in jeweils mindestens 25 Samenkanälchen bestimmt.

In der statistischen Auswertung der Daten konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der KZ detektiert werden, während die Zahl der SZ keinen solchen Unterschied aufwies (s.Abb.24).



**Abbildung 24:** Ergebnis der quantitativen Evaluation der Keimtubuli in HE-gefärbten Schnitten. Die roten bzw. blauen Balken geben die durchschnittliche Anzahl von SZ bzw. KZ pro Tubulus im Hodenquerschnitt von acht Tage alten WT- und SCCx43KO-Mäusen wieder. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. Der signifikante Unterschied ( $p < 0,05$ ) in der KZ-Zahl wird durch \* markiert. WT-Mäuse haben an Tag acht nach der Geburt durchschnittlich  $3,24 \pm 1,78$  KZ und  $23,17 \pm 5,92$  SZ. KO-Mäuse dagegen haben nur  $1,02 \pm 0,89$  KZ und  $22,169 \pm 6,64$  SZ je Tubulusquerschnitt.

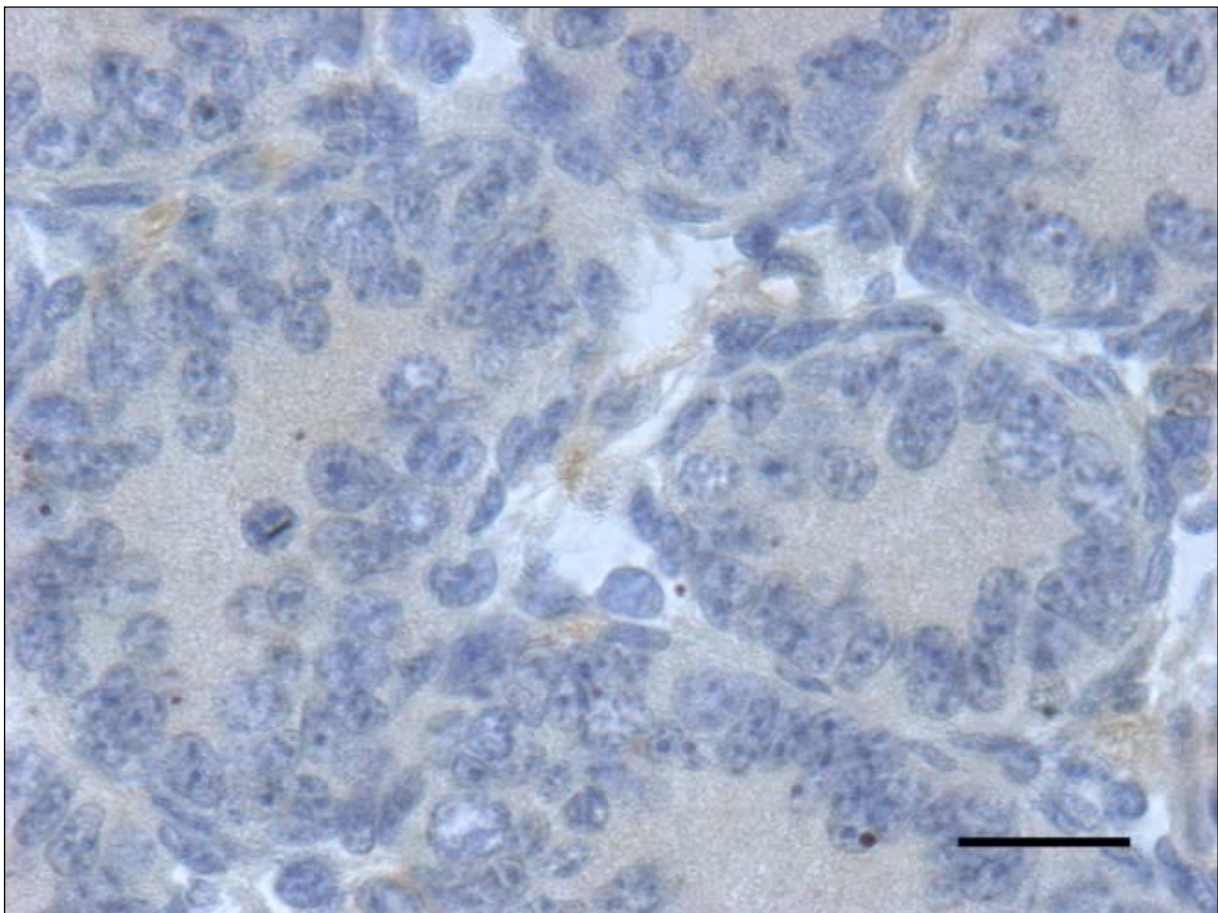
### 3.5 $\beta$ -Galaktosidase-IHC

Um den durch die morphometrische Auswertung der HE-gefärbten Schnitte bestätigten Genotyp zu verifizieren, wurde eine  $\beta$ -Galaktosidase-IHC durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Cx43flox-Mäuse tragen ein LacZ-Reportergen, welches dem Cx43-Gen nachgeschaltet ist. Dieses wird nur dann abgelesen, wenn ein erfolgreicher KO des vorgeschalteten Cx43-Gens stattgefunden hat. Das translatierte  $\beta$ -Galaktosidase-Protein kann mit Hilfe einer IHC in den Zellkernen der SZ detektiert werden und stellt somit die

Möglichkeit der Überprüfung des in der PCR-Reaktion festgestellten Genotyps dar. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Mäusen konnte der Genotyp auf diese Weise bestätigt werden.

### 3.5.1 WT-Mäuse

In diesen Mäusen wird das  $\beta$ -Galaktosidase-kodierende LacZ-Gen nicht abgelesen, d.h. es konnte in keiner der WT-Mäuse ein immunopositives Signal in den Kernen der SZ gefunden werden (s.Abb.25).



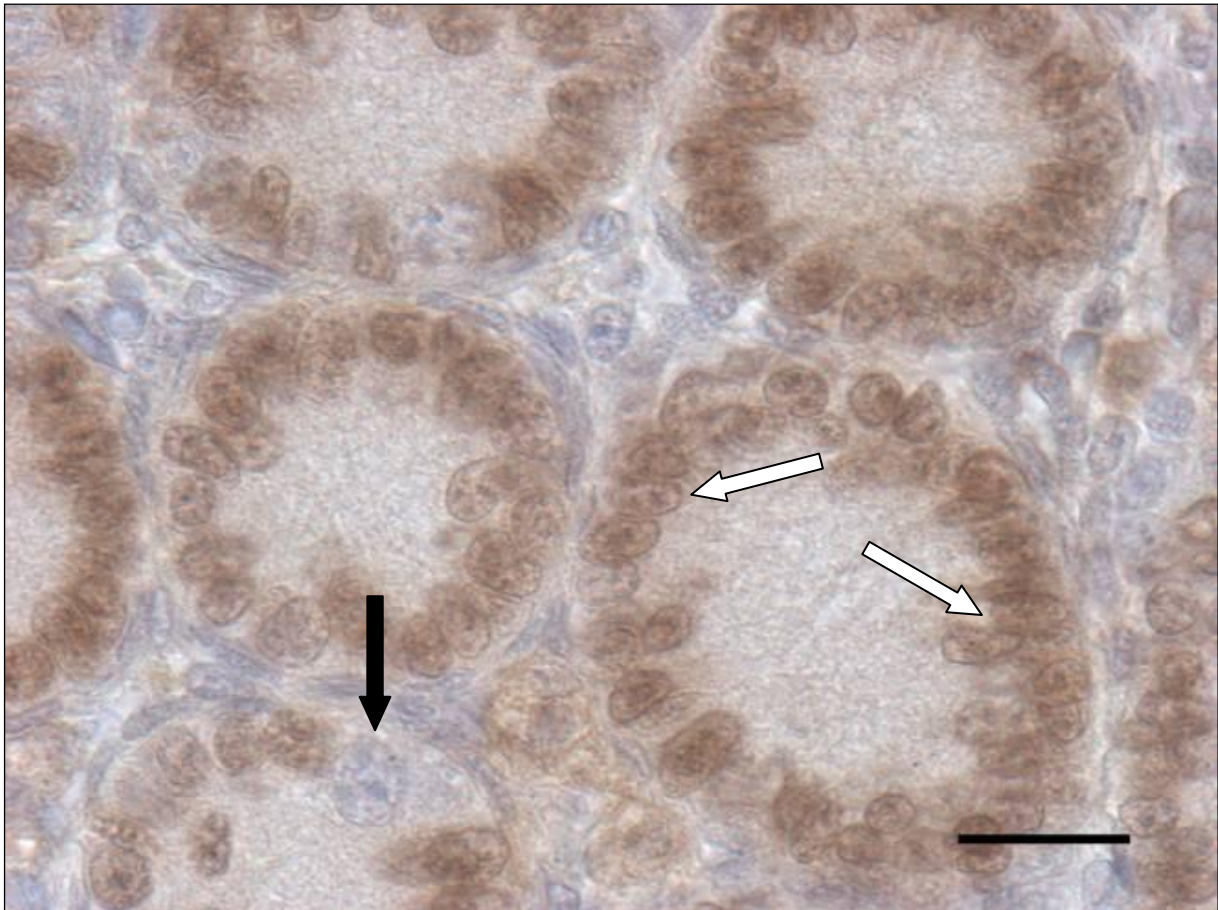
**Abbildung 25: Repräsentative  $\beta$ -Galaktosidase-IHC einer acht Tage alten WT-Maus.**

**Es ist kein  $\beta$ -Galaktosidase-Immunsignal in den SZ-Kernen detektierbar. Der Meßbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .**



### 3.5.2 SCCx43KO-Mäuse

Bei den verwendeten homozygoten SCCx43KO-Mäusen konnte ein deutlich positives Signal in allen Kernen der SZ beobachtet werden (s.Abb.26).

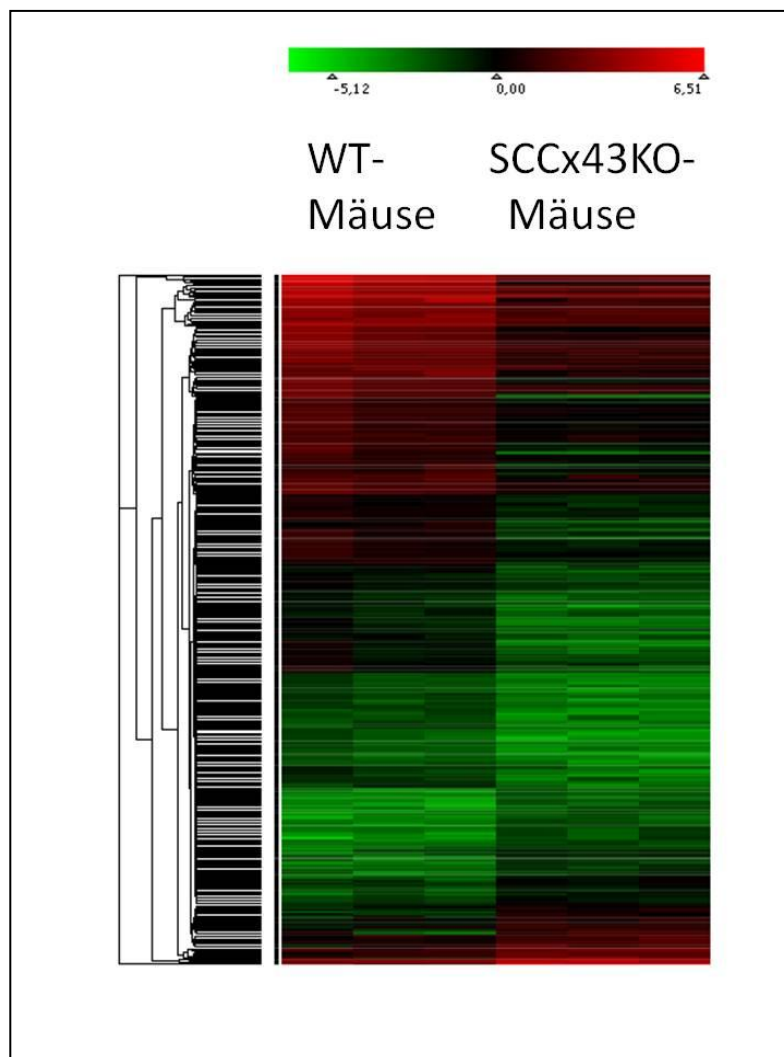


**Abbildung 26: Repräsentative  $\beta$ -Galaktosidase-IHC einer acht Tage alten SCCx43KO-Maus.**  
Es ist ein deutliches Signal in den SZ-Kernen (weiße Pfeile) sichtbar, während peritubuläre Zellen, Spermatogonien (schwarzer Pfeil) und Leydigzellen immunonegativ bleiben. Der Meßbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.6 Microarray-Analyse

#### 3.6.1 Signifikant regulierte Gene

Nach der Elimination von „Ausreißern“ und der statistischen Auswertung der Daten erwiesen sich 658 Gene im Vergleich der Hoden der acht Tage alten WT-Mäuse mit denen der SCCx43KO-Mäuse als signifikant reguliert. In Abbildung 27 erkennt man das hierarchische Cluster und den Heatplot der signifikant regulierten Gene.



**Abbildung 27: Hierarchisches Cluster und Heatplot der signifikant regulierten Gene.**

Die rote Farbe zeigt die Hochregulierung des Gens an, während grün für die Herunterregulierung steht. Die sechs Mäuse sind in Säulen aufgetragen, während die Gene durch waagerechte Linien symbolisiert werden.

Von den signifikant regulierten Genen waren 135 hoch- und 523 herunterreguliert, 581 dieser Gene sind bereits annotiert. 475 der annotierten Gene sind herunterreguliert und 106 heraufreguliert.

"Hierarchisches Clustern" unterschied deutlich zwischen WT- und KO-Mäusen.

### 3.6.2 GO-Analyse

Mit Hilfe der Internet-basierenden Annotationswerkzeuge DAVID und SOURCE konnten Funktionskategorien unter den signifikant regulierten Genen herausgefiltert werden, die verhältnismäßig überrepräsentiert waren. Es konnten drei relevante Subgruppen für die hochregulierten Gene und sechzehn für die herunterregulierten Gene gefunden werden. Die Cluster der herunterregulierten Gene lassen sich noch einmal in sechs "Obergruppen" zusammenfassen.

Die relevanten Kategorien für die heraufregulierten Gene lauten:

- Chemotaxis
- Zellmigration
- Zytoskelettorganisation

Sie sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Signifikante Funktionskategorien der hochregulierten Gene.**

<b>Chemotaxis</b>	Robo1, S100a9, Zic1, Apbb1, Ccl17, Ccl6, Themis, Ccl9, Cfi, Ltb	0,002	0,063
<b>Zellmigration</b>	Vav3, Tns1, Robo1, Mdga1, S100a9, Esr2, Apbb1	0,005	0,041
<b>Zytoskelettorganisation</b>	Acta1, S100a9, Cnn1, Apbb1, Tacc2	0,046	0,186

Die relevanten Kategorien für die herunterregulierten Gene lauten:

- Spermatogenese
- Zellzyklus/Meiose
- Transkription
- Sexuelle Differenzierung
- Zellmigration
- DNA-Modifikation und Translation

Sie sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Signifikante Funktionskategorien der herunterregulierten Gene.**

<b>Spermatogenese</b>	Adad1, Asz1, Ccnb1ip1, Chrna7, Clgn, D1pas1, Dazl, Ddx25, Dmc1, Dnd1, Figla, Foxl2, Ggt1, Hmga1, Mael, Morc1, Msh4, Ovol1, Piwil2, Rad51c, Rec8, Rnf17, Sohlh1, Sohlh2, Sox3, Spata19, Spata5, Stra8, Sycp2, Sycp3, Taf7l, Tcf15, Tdrd1, Tex11, Tex15, Tle3, Zbtb16, Zbp1, Rad51c	4,43E-14	2,48E-12	
<b>Zellzyklus/ Meiose</b>	Ccnb1ip1, Cdkn2a, Clgn, Cpeb1, Dmc1, Fanci, Fsd1, Hells, Hormad1, Hormad2, Mael, Msh4, Nek3, Ovol1, Piwil2, Rad51, Rad51c, Rbm38, Rec8, Smc1b, Stra8, Suv39h2, Sycp1, Sycp2, Sycp3, Tdrd1, Tex11, Tex15, Trnp1, Uba3, Uhmk1	2,36E-15	0,004	
<b>Transkription</b>	Cbx2, Cdkn2a, Dazl, Eaf2, Ehf, Fgf8, Foxl2, Gabpa, Glis1, Grhl3, Gtpbp4, Hells, Hmga1, Hmx1, Hnf1b, Htatip2, Irf6, Isl1, Krt17, Lin28a, Mael, Nfib, Ovol1, Ovol2, Pax8, Piwil2, Pou2f2, Pou3f3, Rictor, Rnf128, Sall4, Satb1, Shh, Six2, Spink12, Stra8, Tdrd1, Utf1, Zbtb16, Zbtb42	0,001	0,041	



<b>Sexuelle Differenzierung</b>	Ascl2, Ccnb1ip1, Cdh1, Chrna7, Col4a3bp, Dmc1, Fgf8, Foxf1a, Foxl2, Gabpa, Cx43, Hnf1b, Kif3a, Krt8, Lhx8, Msh4, Ovol2, Sall4, Shh, Six2, Sohlh1, Spint1, Stra8, Sycp2, Tex11, Tex15	0,003	0,049
<b>Zellmigration</b>	Asz1, Chrna7, Dab1, Fgf8, Cx43, Isl1, Krt14, Krt17, Lhx2, Lhx6, Mesp1, Ovol2, Pou3f3, Reln, Shh, Taf7l, Tnn	0,004	0,049
<b>DNA-Modifikation und Translation</b>	Arih1, Asb9, Ate1, Dazl, Dnahc12, Fbxo15, Foxl2, Hells, Herc3, Krt17, Lin28a, Mael, Oas2, Piwil2, Psma8, Psmb9, Rffl, Rictor, Rnf128, Satb1, Siah1b, Stra8, Suv39h2, Tdrd1, Uba3, Uba6, Ube2e3, Uchl1, Usp12, Usp18, Usp37, Usp45, Zyg11b	0,004	0,181

### 3.6.3 KZ-spezifische Gene

Der Großteil der signifikant regulierten Gene kann der funktionellen Kategorie „Spermatogenese“ zugeordnet werden. Bei der näheren Betrachtung dieser mit Spermatogenese assoziierten Gene, konnte ein Großteil als KZ-spezifisch identifiziert werden. Zu diesen Genen zählen Adad1, Asz1, Clgn, D1pas1, Dazl, Ddx25, Figla, Mael, Morc1, Ovol1, Piwil2, Hnf1b, Rnf17, Sohlh1, Sohlh2, Sox3, Stra8, Sycp2, Taf7l, Tcf15, Tdrd1, Tex11, Tex15, Zbtb16 und Zbp1 (Ballow et al. 2006a; Ballow et al. 2006b; Cheng et al. 2007; Connolly et al. 2005; Dai et al. 1998; Gutti et al. 2008; Hu et al. 2010; Ikawa et al. 2011; Inoue et al. 1999; Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Lin et al. 2007; Maruyama et al. 1998; Nayernia et al. 2006; Raverot et al. 2005; Reber und Cereghini 2001; Ruggiu et al. 1997; Session et al. 2001; Smith et al. 2004; Soper et al. 2008; Wang et al. 2001; Yan et al. 2002; Yang et al. 2006; Yang et al. 2008; Zhou et al. 2008). Nach Korrektur der Expressionwerte dieser genannten Gene um den Faktor  $1/(\varnothing_{KZ-Zahl})$  (um Genexpressionsunterschiede aufgrund

einer unterschiedlichen KZ-Zahl auszuschließen) blieben die Veränderungen dennoch signifikant.

### 3.6.4 Pathway-Analyse

Mit Hilfe des „PathwayExplorer“ und der „Ingenuity Pathways Analysis“-Software konnten verschiedene Signalwege identifiziert werden, die von den signifikant regulierten Genen beeinflusst werden.

#### 3.6.4.1 Funktionelle Analyse des gesamten Datensatzes

Die Funktionen/ Krankheiten, die sich im gesamten Datensatz als signifikant überrepräsentiert herausstellten, lassen sich zum überwiegenden Teil in folgende sieben Obergruppen zusammenfassen:

- Funktionen, die in Relation zu der sexuellen Differenzierung stehen
- Funktionen, die in Relation zum Zellzyklus stehen
- Funktionen, die in Relation zur Transkription stehen
- Funktionen die in Relation zur Synapsis stehen
- Funktionen, die in Relation zur Immunantwort stehen
- Funktionen, die in Relation zur Apoptose stehen
- Funktionen, die in Relation zum Kohlenhydrat-Stoffwechsel stehen

#### 3.6.4.2 „Network“-Bildung

Es konnten fünfundzwanzig Netzwerke gefunden werden, in denen signifikant regulierte Gene eine Rolle spielen. In den nachfolgenden zehn Netzwerken (s.Tab.8) sind neun oder mehr signifikant regulierte Gene beteiligt:

**Tabelle 8: Netzwerke, in denen signifikant regulierte Gene von Bedeutung sind und ihre Funktionen.**  
**Rote Schrift gibt eine Hochregulierung des jeweiligen Gens an, grün seine Herunterregulierung.**  
**Schwarze Gene sind nicht signifikant reguliert.**

ID	Moleküle im Netzwerk	Score	Zahl der veränderten Gene	Hauptfunktionen/ -Krankheiten
1	<b>Ccl9</b> , <b>Cdkn2a</b> , <b>Crkl</b> , <b>Cxcl9</b> , <b>Dab1</b> , Daz2, <b>Ddx4</b> , <b>Dnmt3b</b> , Erk, <b>Fam3b</b> , Gad1, Gas2, <b>Gja1</b> , Histone H3, <b>Hmga1</b> , <b>Hoxa11</b> , Ifit1b, <b>ligp1/ligp1b</b> , Il12 (complex), Interferon alpha, <b>Irf7</b> , <b>Kpna2</b> , <b>Ltb</b> , Mhc Class I (family), Ms4a4b, <b>Piwil2</b> , <b>Psmb9</b> , <b>Reln</b> , <b>Rna</b> <b>Polymerase Ii</b> , <b>Stat1</b> , <b>Tap1</b> , <b>Tgtp1</b> , <b>Upp1</b> , <b>Usp18</b> , <b>Zbp1</b>	33	26	Infektionskrankheiten, Genexpression, Antigenpräsentation
2	<b>Abcb7</b> , Actb, B2m, Casp9, <b>Ccl6</b> , Ccl21, <b>Cd274</b> , <b>Cxcl9</b> , <b>Eaf2</b> , Ebi3, <b>Ero1l</b> , Fgl2, <b>Gbp4</b> , <b>Gbp8</b> , Gbp2, Ifit1b, Ifnb1, Ifng, <b>Igf2bp1</b> , <b>Igtp</b> , Il5, Il27, Il7r, Isg15, Nr3c1, <b>Oas2</b> , <b>Oasl2</b> , <b>Pcp4</b> , <b>Serinc3</b> , Socs1, Stat2, <b>Tgtp1</b> , Txn	18	15	Zell-zu-Zell Interaktion und Kommunikation, Entwicklung und Funktion des Hämatologischen Systems, Gewebsmorphologie
3	<b>Acta1</b> , <b>Baz1a</b> , Bcl2l1, Birc5, Ccnd1, <b>Chrna7</b> , <b>Crabp1</b> , Cxcl3, Cxcl10, Cyp2f1, <b>Dkk2</b> , <b>Esr2</b> , Fabp4, <b>Ggt1</b> , Gnaq, <b>Gtf2a1</b> , <b>Hells</b> , Hmgcr, Ikbkb, Jak2, Lep, Mapk, Mat2a, <b>Myh3</b> , Myhs, Myod1, <b>Nfkbie</b> , Rbbp4, Socs3, <b>Stat1</b> , <b>Suv39h2</b> , Tnf, <b>Tnn</b> , <b>Tnnc2</b> , Yyl	15	15	Genexpression, Krebs, Herznekrose/ Zelltod

ID	Moleküle im Netzwerk	Score	Zahl der veränderten Gene	Hauptfunktionen/ -Krankheiten
4	Arg2, Arl5b, Cbx2, Cdk2, Dmrt1, Dmrtd2, Dusp4, E2f1, E2f4, Fgfr2, Foxl2, Fshb, Isl1, Lhb, Mphosph9, Nr1h3, Nr5a1, Osbp2, Pin1, Ppm1h, Smad3, Sohlh1, Star, Stra8, Utf1, Zfp36	13	13	Embryonalentwicklung, Organentwicklung, Ontogenese
5	Ak4, Arih1, Ccl17, Cdk2, Cebpz, Clgn, E330020d12rik, Erk1/2, F2rl1, Fbxw12, Figla, Fos, Gli2, Hdac2, Histone H3, Histone H4, Il13, Il1b, Jnk, Jun, Kitlg, Ldhc, Mapk14, P38 Mapk, Rasa2, Rb1, Rna Polymerase Ii, Socs3, Srf, Taf7l, Tcof1, Tdrd1, Tlr4, Tnfsf11, Uba3	12	14	Genexpression, Gewebemorphologie, Zellentwicklung
6	Adad1, Bcl2, Bcl2l1, Cd8a, Chchd2, Csf1, Csf1r, Dnah12, Fcer1, Fdft1, Hmgcr, Ifit3, Igg1, Igm, Il4, Il21, Il27, Itgav, Itgb3, Kcnab2, Lck, Mtl1e, Nfatc1, Phb, Plcg2, Pou2f2, Rasgrf1, Rhoa, Rora, S100a9, Satb1, Spata19, Vav3, Ybx2, Zbtb16	12	12	Zell-zu-Zell Interaktion und Kommunikation, Entwicklung und Funktion des Hämatologischen Systems, Zellwachstum und -Proliferation
7	Akt, Alp, Bcl2, Bcl2l1, Brca1, Brca2, Casp3, Ccnd1, Cdkn1a, Cdkn2a, Cnr1, Crebbp, Ddx25, Ep300, Gata1, Hdac1, Hnf1a, Hoxa10, Htt, Kif12, Krt14, Mdm2, Meis2, Nfkb1a, Plcb1, Rad51, Rap1gap, Rb1, Rnase4, Runx2, Slc7a2, Stat1, Tp53, Ttk, Wdr5	11	13	Genexpression, Krebs, Zellentwicklung

ID	Moleküle im Netzwerk	Score	Zahl der veränderten Gene	Hauptfunktionen/ -Krankheiten
8	<b>Actg2</b> , Aldob, <b>Cdh1</b> , <b>Cnn1</b> , Dync2li1, Fhl1, Foxa1, Foxa2, Gata6, Gli1, Gli2, <b>Grhl1</b> , Hdac1, Hdac2, Hhip, Hltf, <b>Hnf1b</b> , Hnf4a, <b>Ikzf3</b> , <b>Krt8</b> , <b>Krt17</b> , Lrp5, Mi2, <b>Mybpc1</b> , Myocd, Nr1h4, Nr5a2, Onecut1, Pax2, Rbbp4, <b>Rhpn2</b> , <b>Sall1</b> , <b>Sall4</b> , <b>Shh</b> , Slc2a2	11	13	Genexpression, Embryonalentwicklung, Ontogenese
9	<b>Akr1b7</b> , Alp, <b>Apbb1</b> , App, <b>Aqp7</b> , Atf2, Blnk, Cav1, Ccnd1, Ccnd2, Ccnd3, Cebpa, Cebpb, Ctnnb1, Dkk1, <b>Dtx2</b> , Egfr, Fabp4, <b>Fgf8</b> , <b>Fkbp6</b> , Histone H3, <b>Map4k1</b> , <b>Mesp1</b> , Msx1, Myc, Myog, <b>Ndr4</b> , <b>Phlda2</b> , Ppard, Pparg, <b>Prkg2</b> , <b>Prss8</b> , Runx2, <b>Tex19.1</b> , Wnt3a	11	13	Zellentwicklung, Genexpression, Zellzyklus
10	<b>Arc</b> , <b>Camk4</b> , Cebpb, Creb1, Creb, Crem, Dlg4, <b>Dusp14</b> , <b>Egr4</b> , Fmr1, <b>Gabpa</b> , Irs2, Nxf1, <b>Nxf2</b> /Nxf2b, <b>Pak1</b> , <b>Pdxxk</b> , <b>Pik3cb</b> , Ppara, Ppard, Ppargc1a, Sik1	8	9	Neurologische Erkrankungen, Organismusverletzungen und- Abnormitäten, Gewebsmorphologie

### 3.6.4.3 Korrelation zwischen den signifikant regulierten Genen und Cx43

Von den fünfundzwanzig Netzwerken, die mit Hilfe des Programms identifiziert werden konnten, ist in nur ein Netzwerk (**ID 1**) Cx43(=Gja1) direkt eingebunden. Dies bedeutet, dass nur hier ein direkter Zusammenhang zwischen dem deletierten Cx43-Gen und den signifikant veränderten Genen bekannt ist und gefunden werden konnte.

#### 3.6.4.4 Self-made Pathways

Durch die Möglichkeit, Gene auch aufgrund ihrer Interaktionen in bestehende Netzwerke zu integrieren, konnte ein Zusammenhang zwischen dem „Retinoic acid mediated Apoptosis pathway“ und der Deletion von Cx43 gezeigt werden. In diesem Pathway sind folgende signifikant regulierten Gene beteiligt:

Heraufreguliert: Spock1; Ccl17; Kpna2

Herunterreguliert: Crabp1; Stra8; Pax8; Otx1; Ovol1; Gja1(=Cx43); Parp14

#### 3.6.4.5 Canonical Pathways

Es konnten 212 beeinflusste „Canonical Pathways“ gefunden werden. Die zehn am stärksten beeinflussten Pathways sind aus der folgenden Tabelle 9 ersichtlich. Die enthaltenen, signifikant regulierten Gene sind jeweils dahinter notiert:

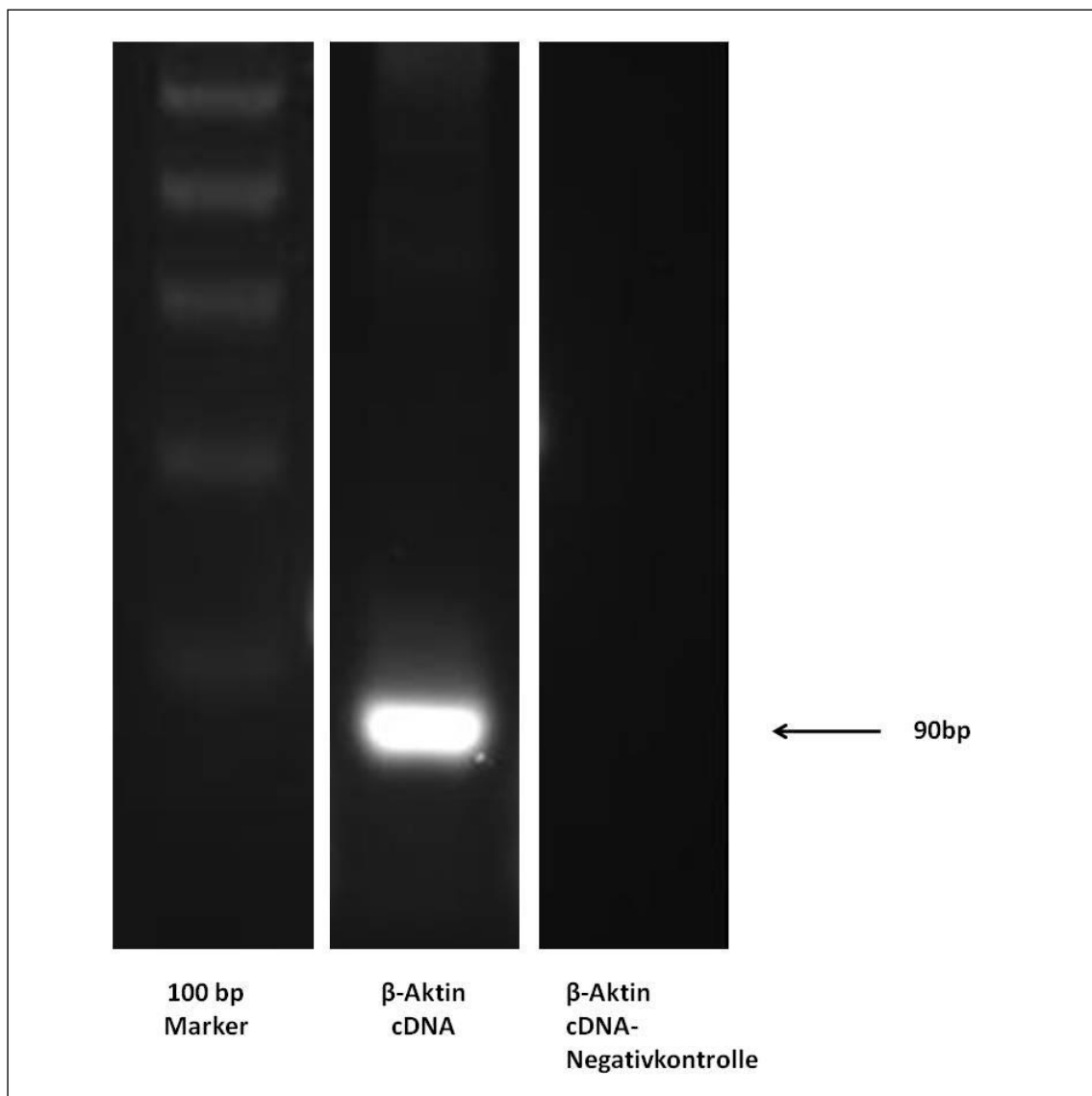
**Tabelle 9: Übersicht über die zehn am stärksten beeinflussten Canonical Pathways und der beteiligten, signifikant veränderten Gene.**

Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	2,850	0,133	Kdm5b, Utf1, Fbxo15, Igf2bp1, Sall4, Phb
Reelin Signaling in Neurons	2,310	0,085	Apbb1, Arhgef12, Crkl, Map4k1, Pik3cb, Dab1, Reln
FAK Signaling	1,540	0,059	Actg2, Pak1, Plcg2, Pik3cb, Tns1, Acta1
Calcium Signaling	1,540	0,044	Camk4, Tnnc2, Myh3, Chrn4, Chrna7, Ryr1, Chrna5, Acta1, Mef2b
Gα12/13 Signaling	1,490	0,055	Cdh1, F2rl1, Nfkbie, Pik3cb, Cdh15, Lpar3, Mef2b
Antigen Presentation Pathway	1,490	0,070	Psmb9, Hla-B, Tap1

Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling	1,460	0,052	Cdkn2a, Gja1, Cdh1, Sfrp2, Wnt9b, Sox3, Tle3, Dkk2, Map4k1
Interferon Signaling	1,320	0,083	Ifit3, Stat1, Tap1
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	1,320	0,045	Camk4, Plcg2, Myh3, Plcb1, Prkg2, Adcy8, Acta1
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	1,280	0,056	Irf7, Nfkbie, Zbp1, Stat1

### 3.7 RT-PCR

Eine Kontroll-PCR der eingesetzten RT-PCR-Produkte, um den gelungenen Verdau der genomischen DNA und die Umschreibung der RNA in DNA zu testen, ergab immer eine spezifische Bande für die neu erstellte cDNA und keine Bande für die Negativkontrolle, bei der die RT-PCR ohne Reverse Transkriptase durchgeführt wurde (s.Abb.28). Hierbei wurde mit dem Housekeeper  $\beta$ -Aktin, der eine spezifische Bande bei 90 bp zeigt, gearbeitet.



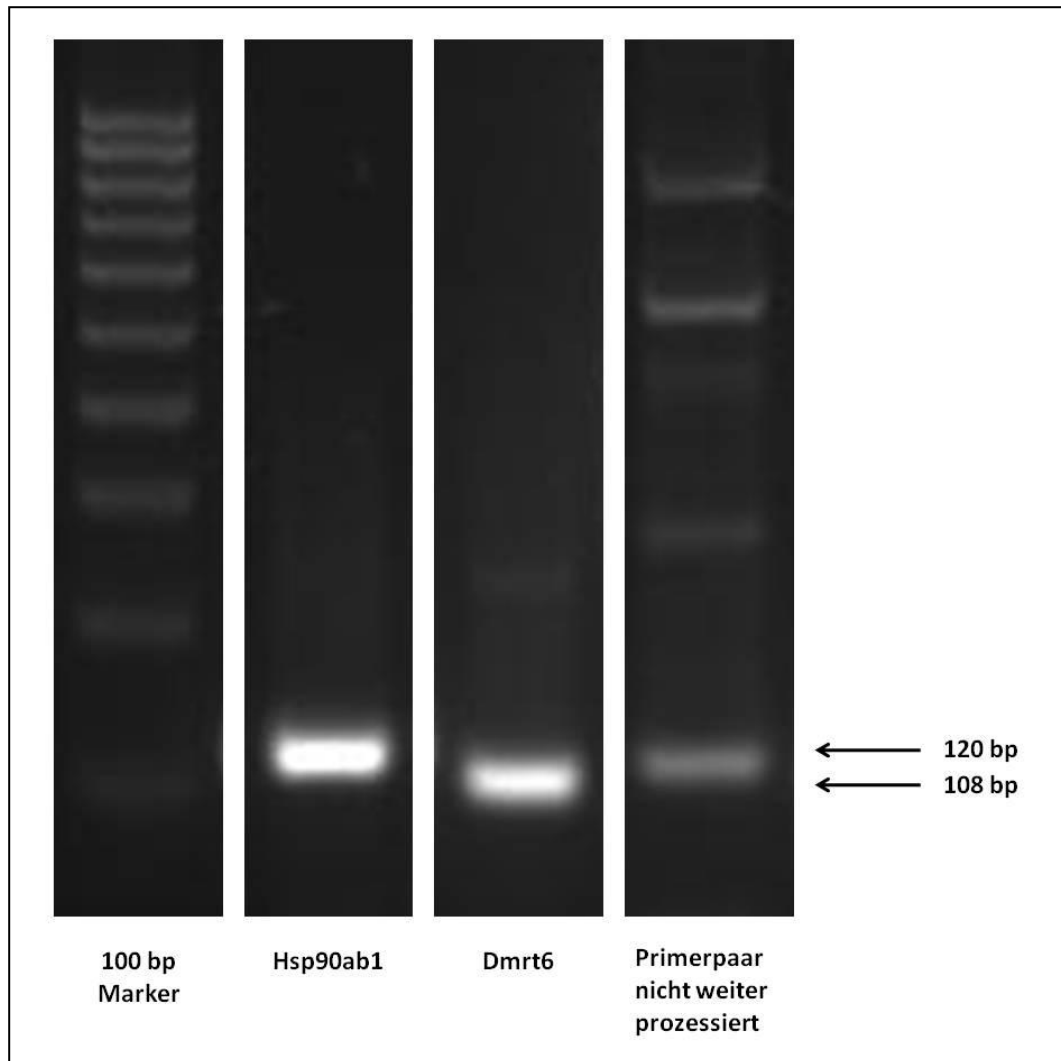
**Abbildung 28: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der  $\beta$ -Aktin-PCR mit den Produkten der RT-PCR.**

Es ist eine deutliche Bande bei 90bp für  $\beta$ -Aktin zu erkennen. Die Negativkontrolle zeigt keine Bande.



### 3.8 qRT-PCR

In der qRT-PCR wurden mit Hilfe zweier Housekeeping Gene zwanzig ausgewählte Kandidatengene auf ihre Expression hin untersucht. Die mit Hilfe der Beacondesigner-Software ausgewählten Primer wurde zunächst in einer konventionellen PCR getestet. Nur diejenigen, die eine einzelne spezifische Bande ergaben, wurden weiter prozessiert (s.Abb.29).

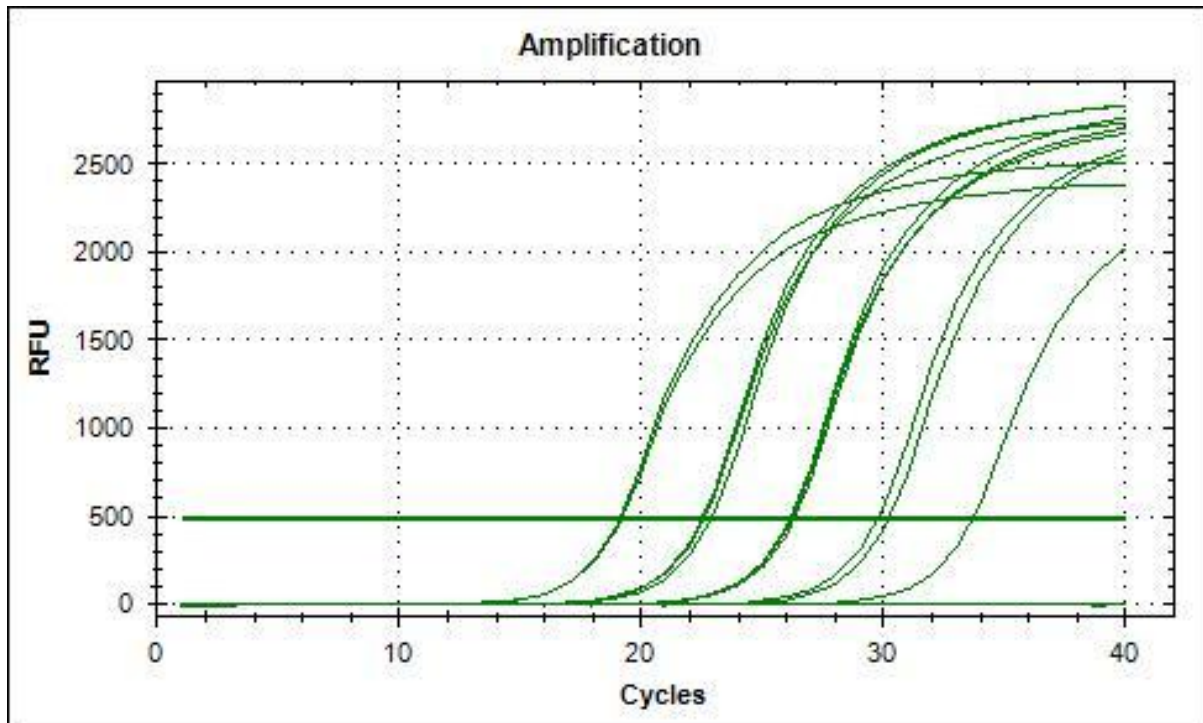


**Abbildung 29: Repräsentatives Ergebnis der Agarosegelelektrophorese dreier getesteter Primerpaare.**

Beispiele für Primerpaare, die eine einzelne, spezifische Bande in der PCR zeigten (Hsp90ab1 mit 120 bp und Dmrt6 mit 108 bp) und ein Primerpaar, welches aufgrund seiner unspezifischen PCR-Produkte aus der Analyse herausgenommen wurde.

### 3.8.1 cDNA-Verdünnungsreihe

Alle getesteten Primerpaare, die für den späteren Genexpressionsvergleich mittels qRT-PCR genutzt wurden, zeigten in der cDNA-Verdünnungsreihe eine Effizienz der DNA-Verdopplung von 75-113% und ein einzelnes Produkt in der Schmelzkurve. Abbildung 30 stellt ein Beispiel für eine cDNA-Verdünnungsreihe dar.



**Abbildung 30: Repräsentative cDNA-Verdünnungsreihe am Beispiel von Hsp90ab1.**

Die waagerechte Linie bei 500 RFU (Relative Fluorescence Units) gibt den Schwellenwert wieder, an dem die Ct-Werte zur Bestimmung der Effizienz gemessen wurden. Die Amplifikationskurven geben von links nach rechts die verschiedenen Verdünnungsstufen der cDNA wieder (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Die x-Achse gibt die Anzahl der qRT-Zyklen wieder; die y-Achse gibt die Fluoreszenzintensität in RFU an.

Abbildung 31 zeigt ein Beispiel einer Schmelzkurve einer qRT-PCR, in der nur ein einzelnes Produkt amplifiziert wurde:

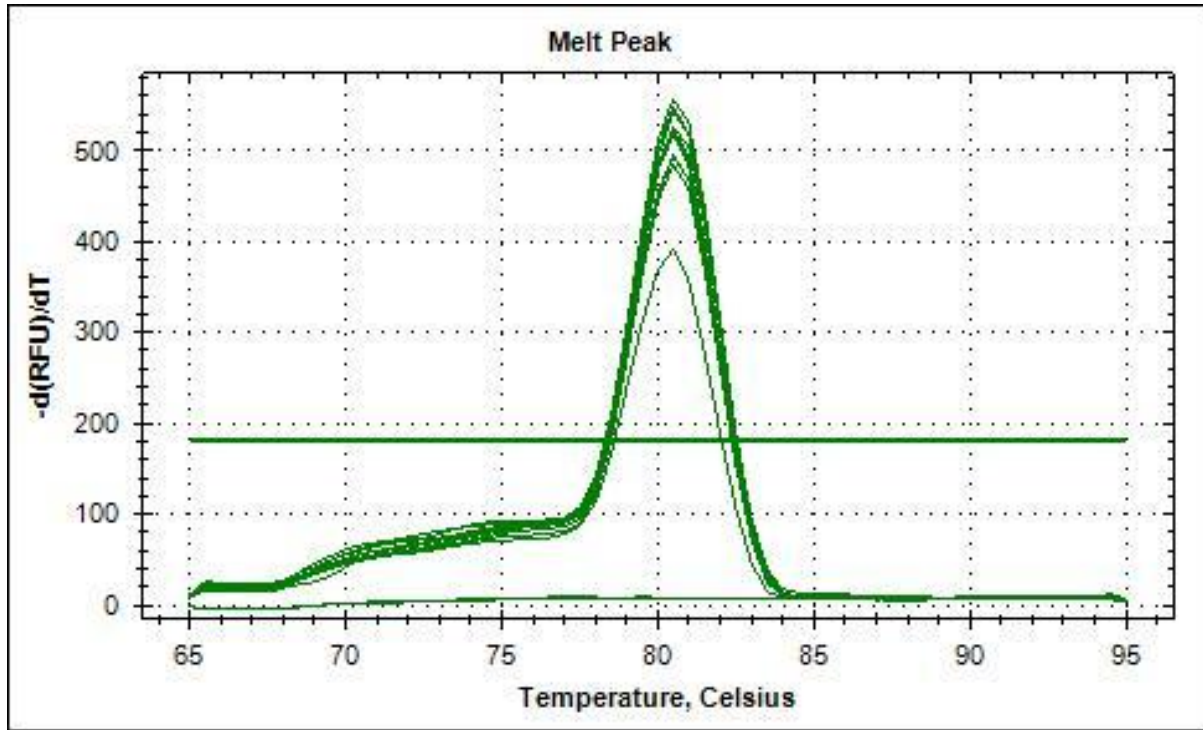
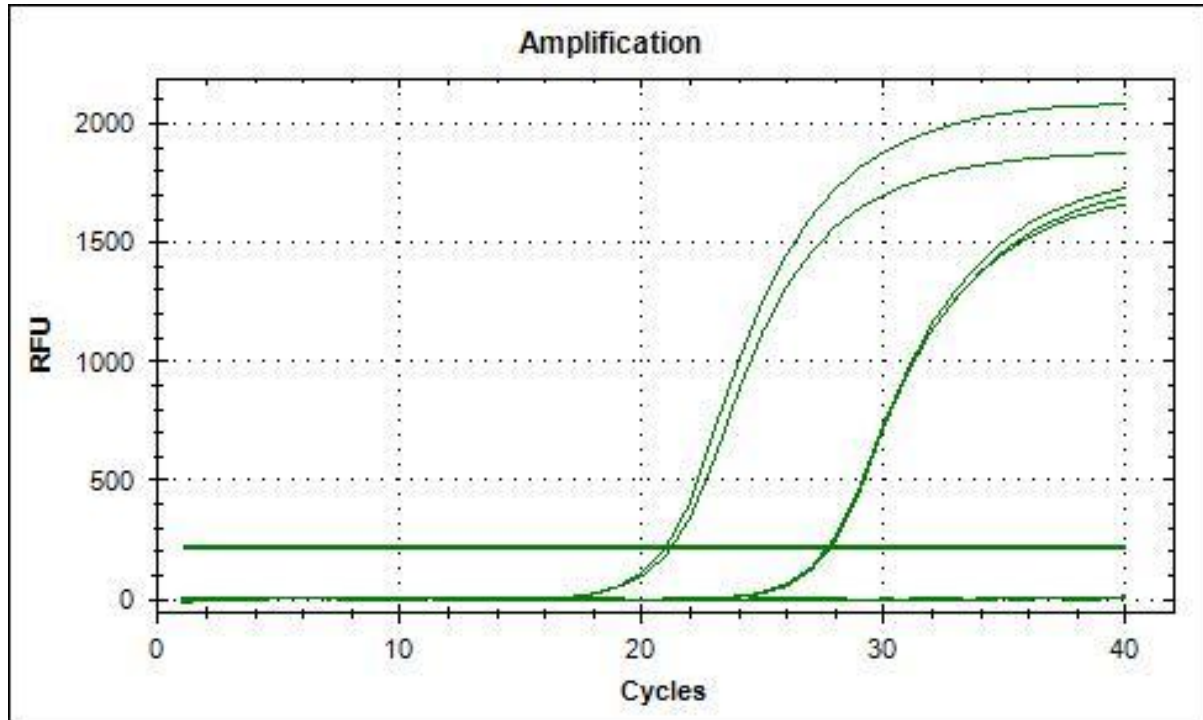


Abbildung 31: Repräsentative Schmelzkurve von Hsp90ab1.

Lediglich ein Peak, an dem alle in der qRT-PCR gebildeten Produkte bei derselben Temperatur aufschmelzen ist zu erkennen. Dies bestätigt, dass nur ein spezifisches Produkt in der Reaktion erstellt worden ist. Die x-Achse gibt die Temperatur in °C wieder; die y-Achse gibt mit  $-d(RFU)/dT$  die Fluoreszenzänderung pro Zeiteinheit an.

Abbildung 32 zeigt ein typisches Beispiel eines Genexpressionsvergleichs zwischen einer WT- und einer SCCx43KO-Maus:

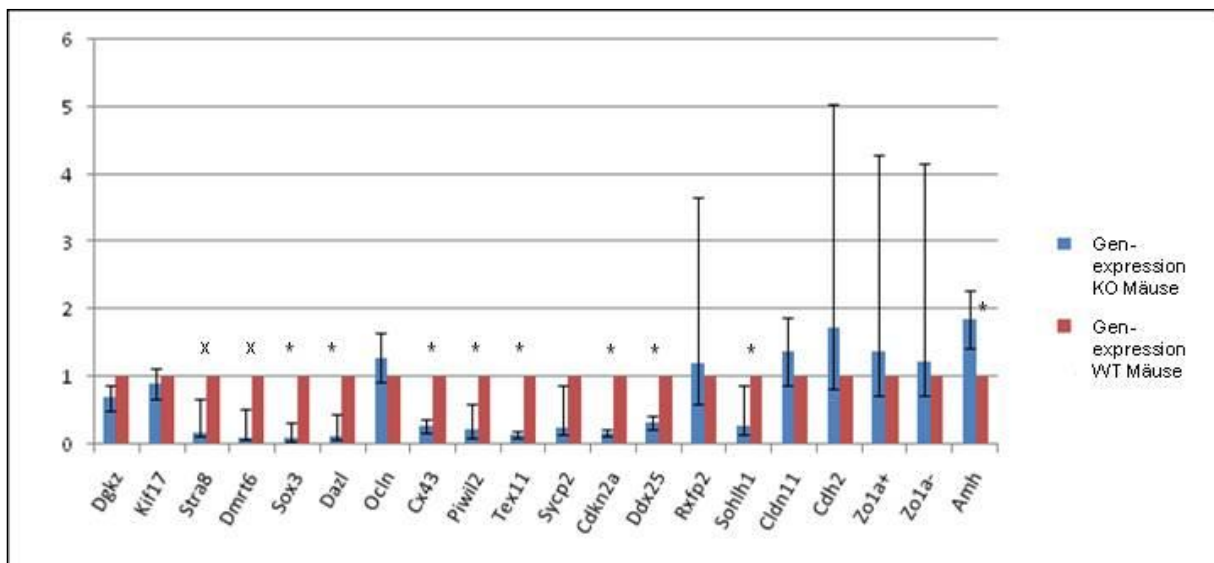


**Abbildung 32: Genexpressionsvergleich am Beispiel von Dmrt6 zwischen einer WT-Maus und einer SCCx43KO-Maus.**

Die SCCx43KO-Maus zeigt einen deutlich früheren Anstieg der Amplifikationskurve. Die x-Achse gibt die Anzahl der qRT-PCR-Zyklen wieder; die y-Achse gibt die relative Fluoreszenzintensität (RFU) an.

### 3.8.1.1 Ergebnis der qRT-PCR

Die Ergebnisse der biologischen Replikate wiesen in allen Fällen nur geringfügige Abweichungen auf. Jedes Experiment wurde unabhängig von den Wiederholungen analysiert. Die statistische Auswertung zeigte, dass im Vergleich der zwei Genotypen neun der getesteten Gene (Sox3, Dazl, Cx43, Piwil2, Tex11, Cdkn2a, Ddx25, Sohlh1, Amh) signifikant reguliert ( $p < 0,05$ ) und zwei (Stra8, Dmrt6) statistisch auffällig sind. Die relativen mRNA-Werte von Sohlh1, Ddx25, Cdkn2a, Stra8, Dmrt6, Sox3, Dazl, Cx43, Piwil2, Tex11 und Sycp2 waren im Vergleich zu den WT-Tieren bei den KO-Mäusen geringer (s.Abb.33).



**Abbildung 33: Die relative Genexpression der WT-Mäuse und der SCCx43KO-Mäuse im Vergleich.** Die Genexpression der WT-Mäuse ist rot und die der SCCx43KO-Mäuse blau dargestellt. Die Balken geben für die Gene Dgkz, Kif17, Ocln, Cx43, Tex11, Cdkn2a, Ddx25, Cldn11 und Amh den Mittelwert +/- der Standardabweichung der drei unabhängigen qRT-PCR-Experimente wieder. Bei den Genen Stra8, Dmrt6, Sox3, Dazl, Piwil2, Sycp2, Rxfp2, Sohlh1, Cdh2, Zo1a+ und Zo1a- werden der geometrische Mittelwert und der einfache Streufaktor angezeigt. Die Berechnungen wurde unter der Bestimmung von  $\beta$ -Aktin und Hsp90ab1 als Housekeeper und Nutzung der  $\Delta\Delta C_t$  Methode durchgeführt. Signifikant regulierte Gene ( $p < 0,05$ ) sind durch \* gekennzeichnet und statistisch auffällige Gene ( $p < 0,056$ ) durch ein x.

### 3.8.2 Korrelation FC Microarray-Analyse und FC qRT-PCR

Die Daten der qRT-PCR waren größtenteils übereinstimmend mit denen des Microarray-Experiments. Es konnte ein Korrelationskoeffizient von 0.88 zwischen den FC der betrachteten Gene in der qRT-PCR und den FC-Werten aus der Microarray-Analyse festgestellt werden.

## 3.9 IHC-Färbungen ausgewählter Gene

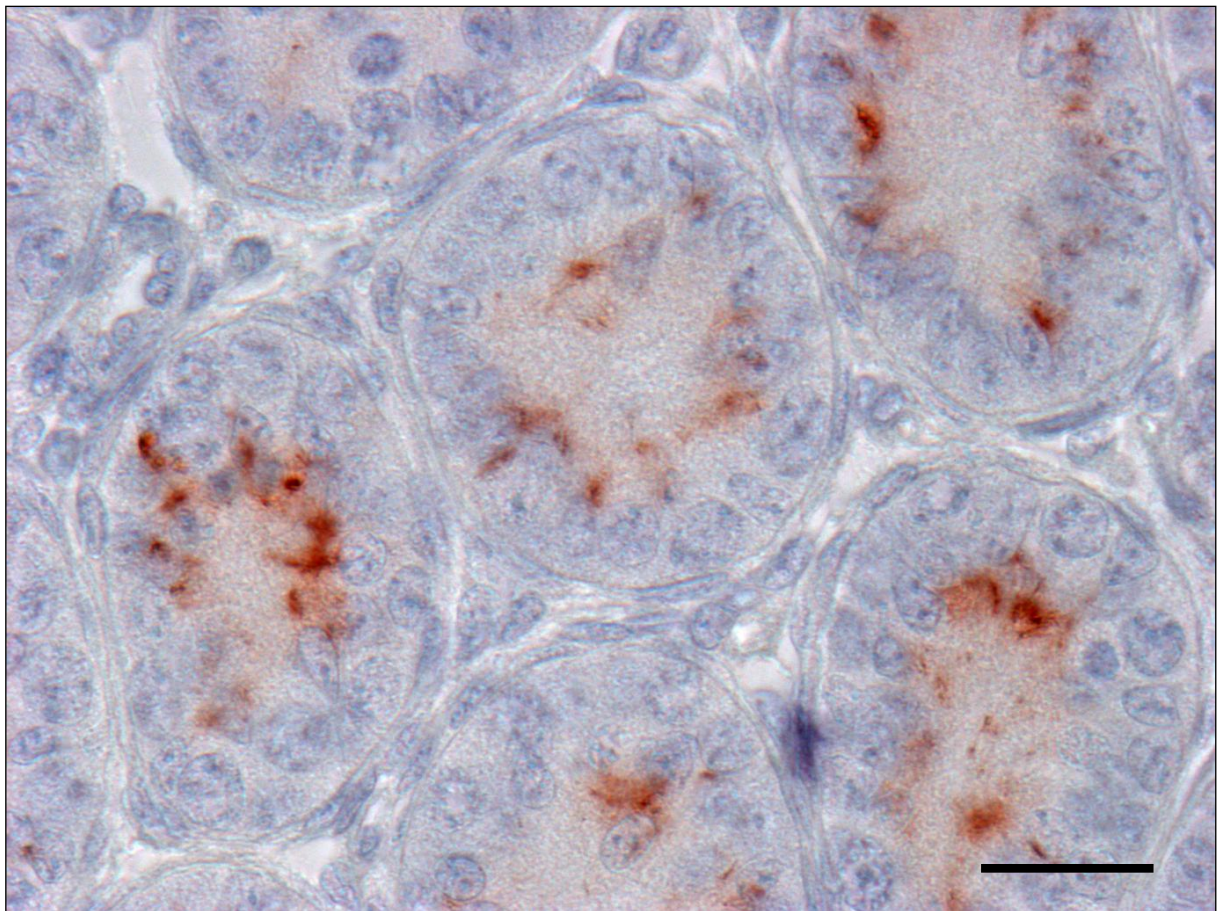
### 3.9.1 Cx43-IHC

Die Cx43-Immunfärbung bestätigte in allen Fällen den mittels PCR sowie durch die  $\beta$ -Galaktosidase-IHC determinierten Genotyp; d.h. auch die Ergebnisse des Microarrays und der qRT-PCR.



### 3.9.1.1 WT-Mäuse

In den Keimsträngen der WT-Tiere konnte eine altersgerecht ausgeprägte Immunreaktion in den Keimsträngen festgestellt werden (s.Abb.34).

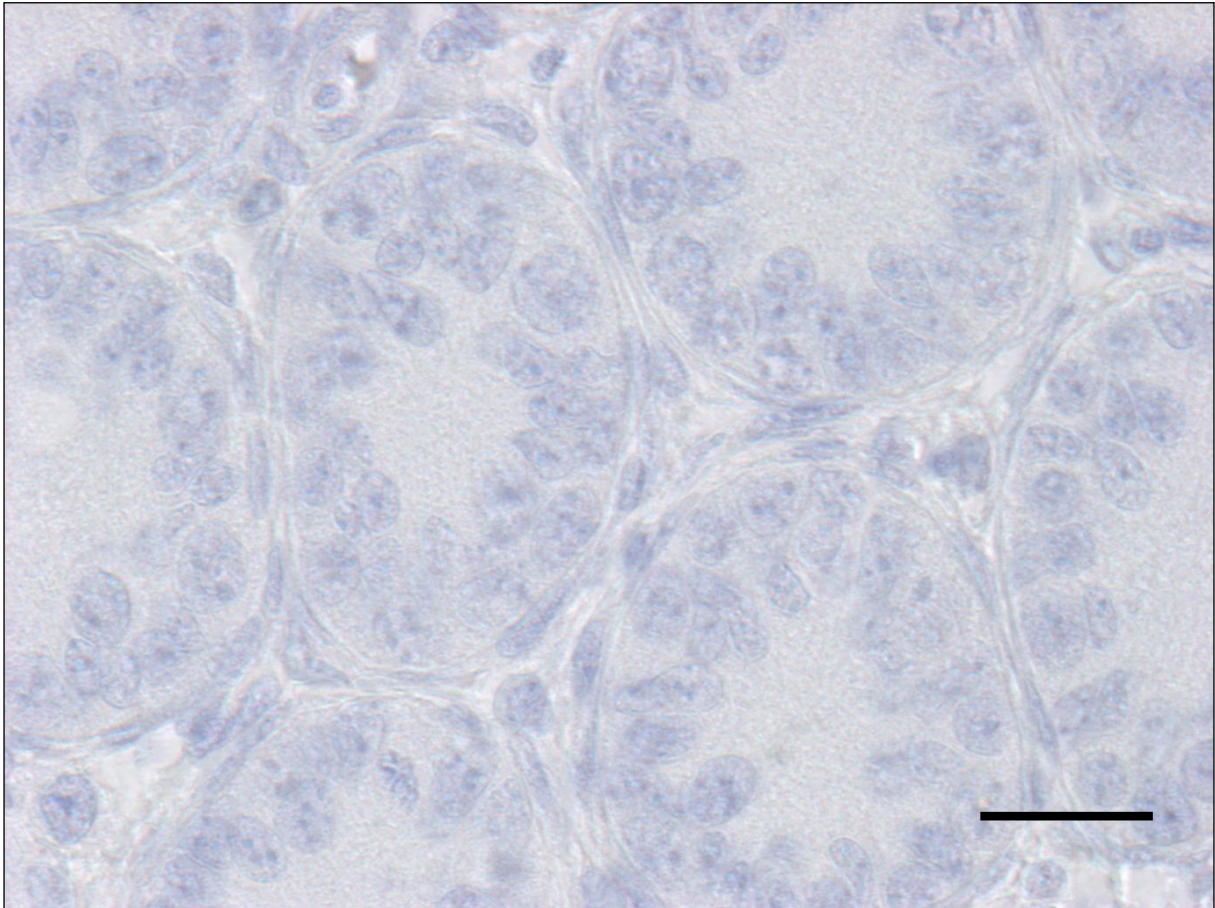


**Abbildung 34: Repräsentative Cx43-IHC einer WT-Maus.**

In den Keimsträngen ist ein für dieses Alter typisches, diffuses zentrales Signal detektierbar. Dieses ist noch weitestgehend luminal und nicht im Bereich der späteren Blut-Hoden-Schranke gelegen. Der Balken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.9.1.2 SCCx43KO-Mäuse

In den SCCx43KO-Mäusen konnte weder in SZ noch in den KZ eine Immunreaktion für das Cx43-Protein nachgewiesen werden (s.Abb.35).



**Abbildung 35: Repräsentative Cx43-IHC einer SCCx43KO-Maus.**

**Die Immunfärbung der acht Tage alten KO-Maus zeigt keine positive Färbereaktion. Weder in den KZ noch in den SZ ist das Cx43-Protein detektierbar. Der Balken entspricht einer Länge von 20 µm.**

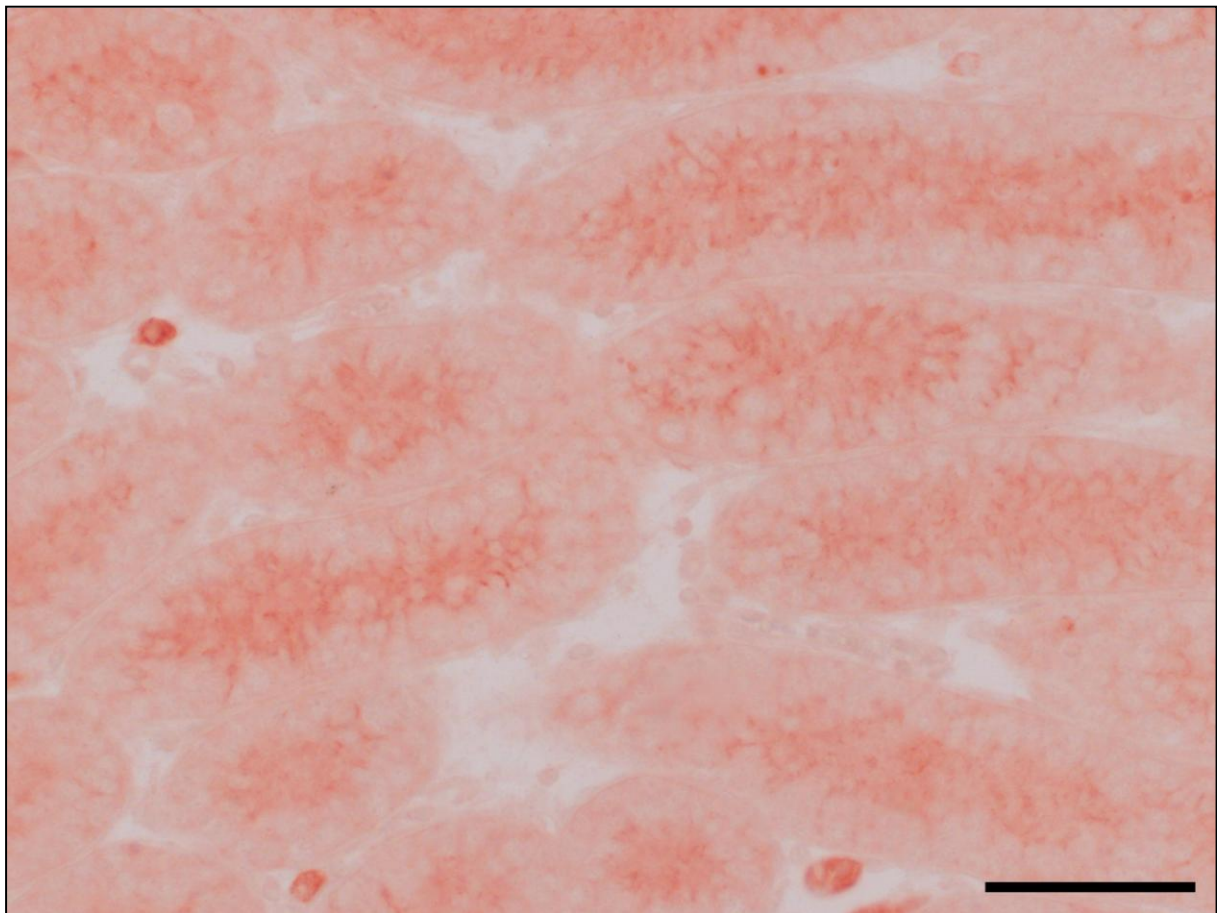


### 3.9.2 Occludin-IHC

Entsprechend der Microarray- und der Occludin-qRT-PCR-Ergebnisse zeigt die Immunfärbung gegen Occludin, zu diesem Zeitpunkt keinen sichtbaren Unterschied zwischen WT- und SCCx43KO-Mäusen.

#### 3.9.2.1 WT-Mäuse

Eine noch leicht diffuse Immunreaktion im SZ-Zytoplasma ist erkennbar (s.Abb.36).



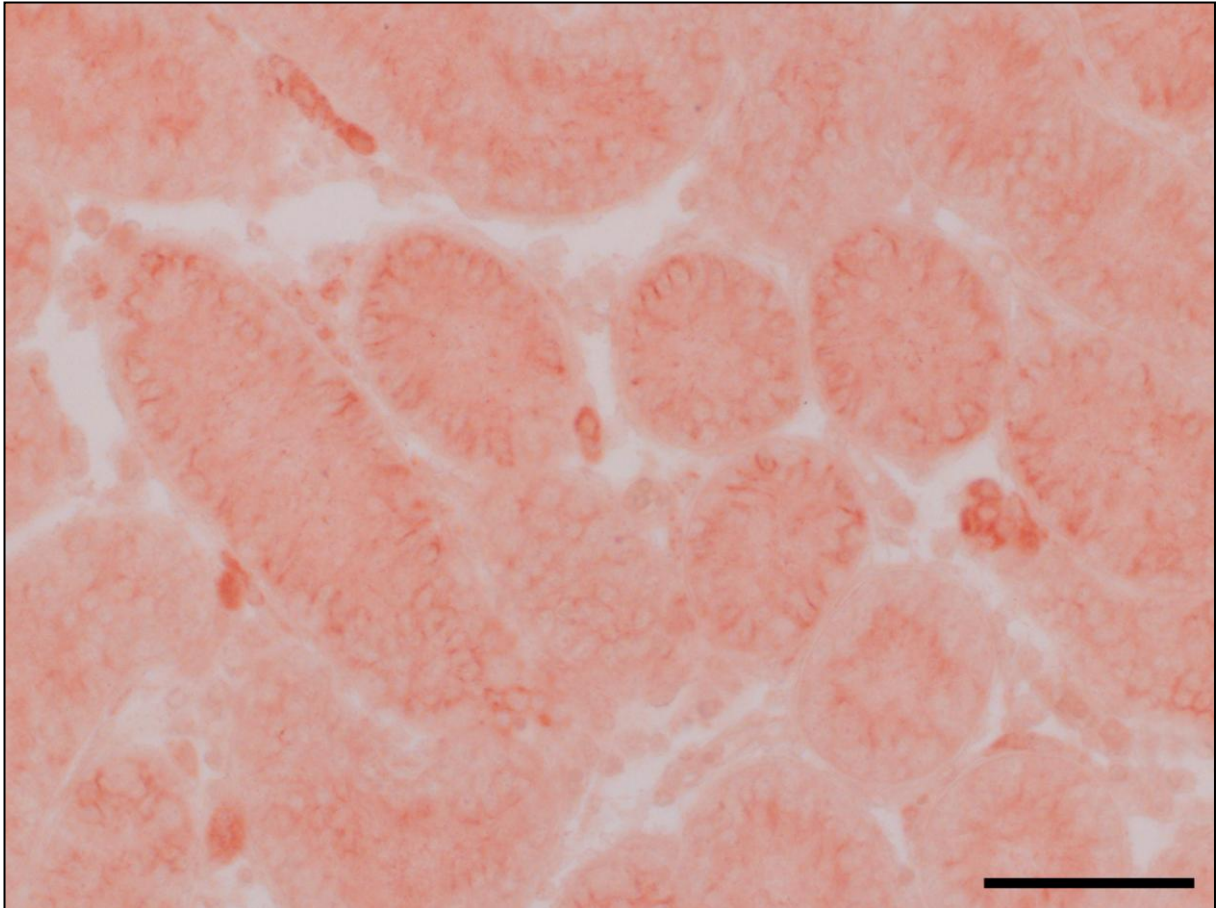
**Abbildung 36: Repräsentative Occludin-IHC einer WT-Maus.**

**Eine diffuse Färbung des SZ-Zytoplasmas, besonders im basalen Bereich der Keimstränge ist erkennbar. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20 µm.**



### 3.9.2.2 SCCx43KO-Mäuse

Bei den SCCx43KO-Mäusen ist ebenfalls eine diffuse Immunreaktion feststellbar. Auch hier ist diese besonders im Bereich der späteren Blut-Hoden-Schranke ersichtlich (s.Abb.37).



**Abbildung 37: Repräsentative Occludin-IHC einer SCCx43KO-Maus.**

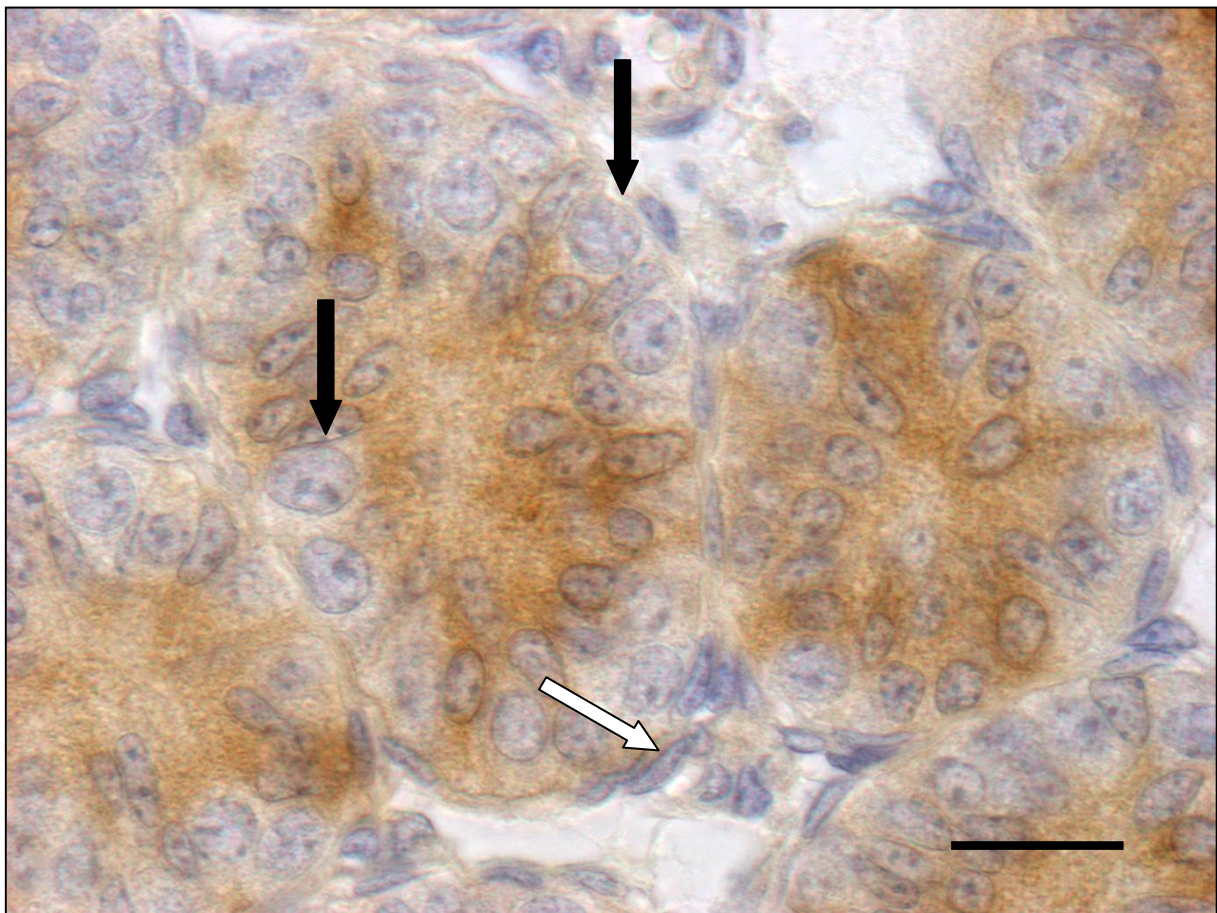
**Eine diffuse Immunoreaktivität ist in den Keimsträngen, besonders im basalen Bereich zwischen den SZ ersichtlich. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20 µm.**

### 3.9.3 Amh-IHC

Sowohl die SZ der WT-Tiere als auch die SZ der SCCx43KO-Tiere zeigen eine deutliche, zytoplasmatische Immunreaktion für Amh.

#### 3.9.3.1 WT-Mäuse

Bei der WT-Maus zeigt sich eine altersgerechte diffuse Färbung des SZ-Zytoplasmas. KZ, Leydigzellen und peritubuläre Zellen zeigen keine Immunreaktion (s.Abb.38).



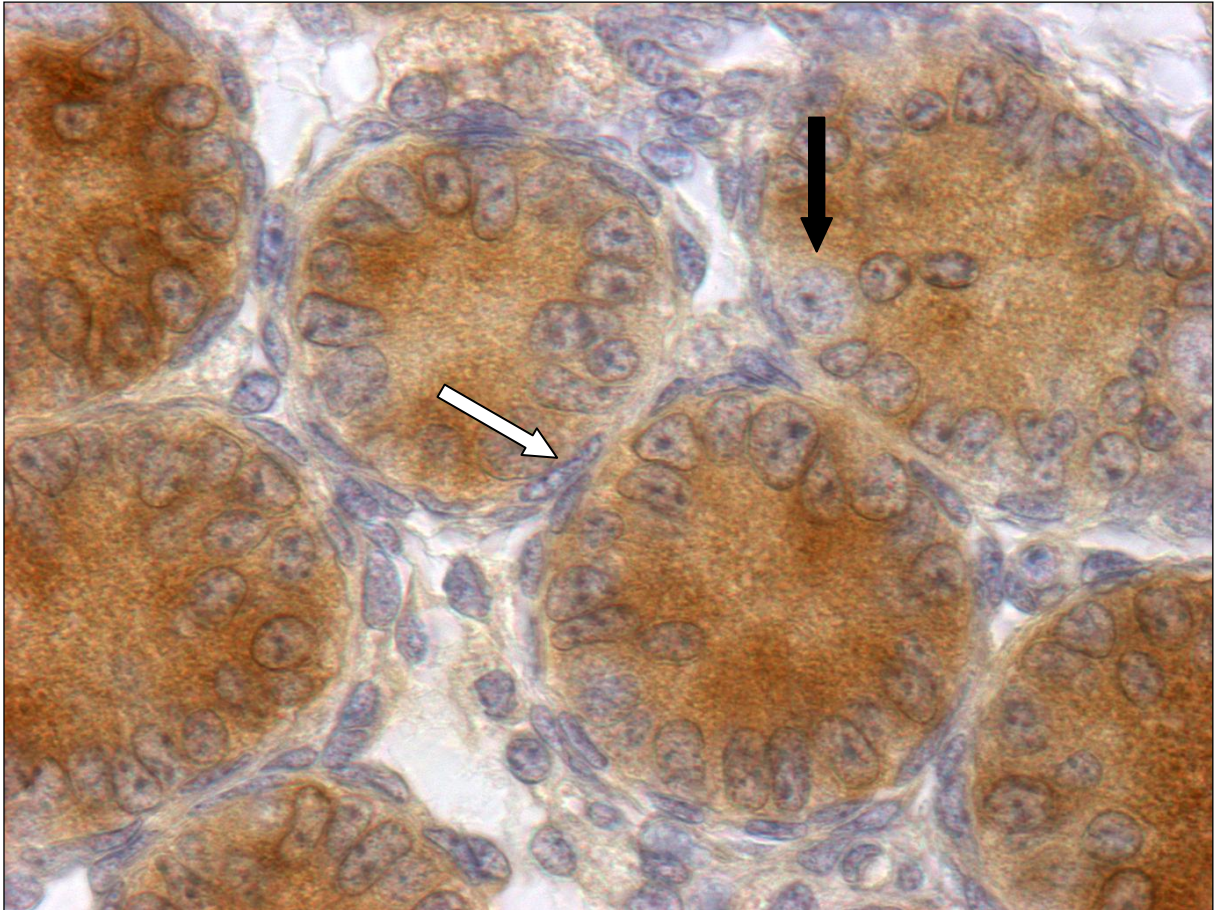
**Abbildung 38: Repräsentative Amh-IHC einer WT-Maus.**

**In den Keimsträngen ist eine unterschiedlich stark ausgeprägte Färbung des SZ-Zytoplasmas sichtbar. KZ (schwarze Pfeile) und peritubuläre Zellen (weißer Pfeil) bleiben ungefärbt. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20 µm.**



### 3.9.3.2 SCCx43KO-Mäuse

Die Immunfärbung des SZ-Zytoplasmas ist in den SCCx43KO-Mäusen an Tag acht p.p. deutlich ausgeprägt (s.Abb.39).



**Abbildung 39: Repräsentative Amh-IHC einer SCCx43KO-Maus.**

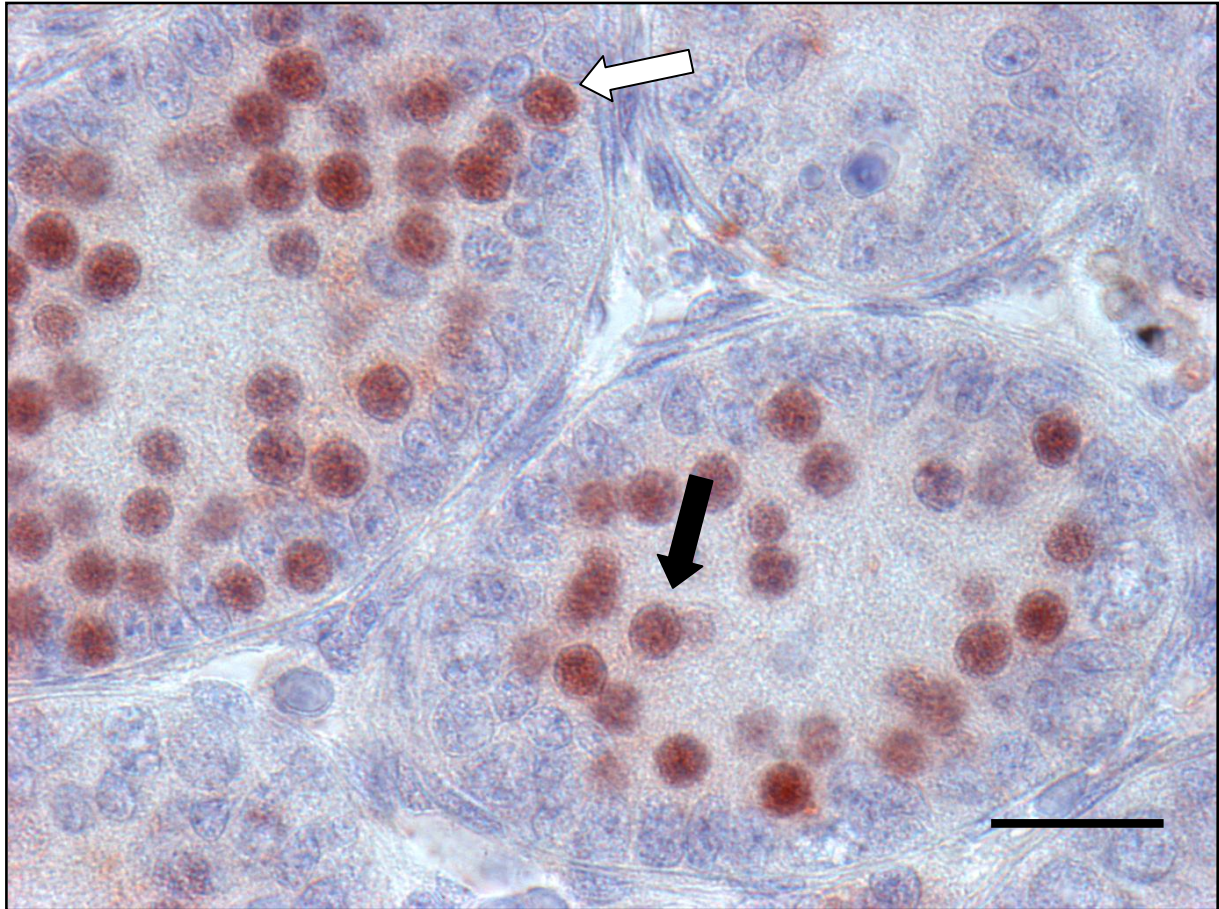
**In den Keimsträngen ist eine deutliche Färbung im SZ-Zytoplasma sichtbar. Auch hier bleiben, wie in den WT-Tieren, KZ (schwarzer Pfeil) und peritubuläre Zellen (weißer Pfeil) ungefärbt. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20 µm.**

### 3.9.4 Stra8-IHC

In der Microarray-Analyse und in der qRT-PCR waren in den KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Mäusen die mRNA-Werte von Stra8, auch nach Korrektur der Werte um die unterschiedliche KZ-Zahl, deutlich reduziert. Es konnte mittels IHC gezeigt werden, dass die Anzahl der Zellen mit einer positiven Farbreaktion in den WT-Mäusen im Vergleich zu den gleichaltrigen SCCx43KO-Tieren deutlich erhöht ist.

#### 3.9.4.1 WT-Mäuse

Die meisten Keimstränge der WT-Mäuse zeigten eine hohe Anzahl von gefärbten KZ. Auch in den Tubuli, in denen die Spermatogenese noch wenig fortgeschritten ist, sind wenige positiv gefärbte Zellen detektierbar (s.Abb.40).



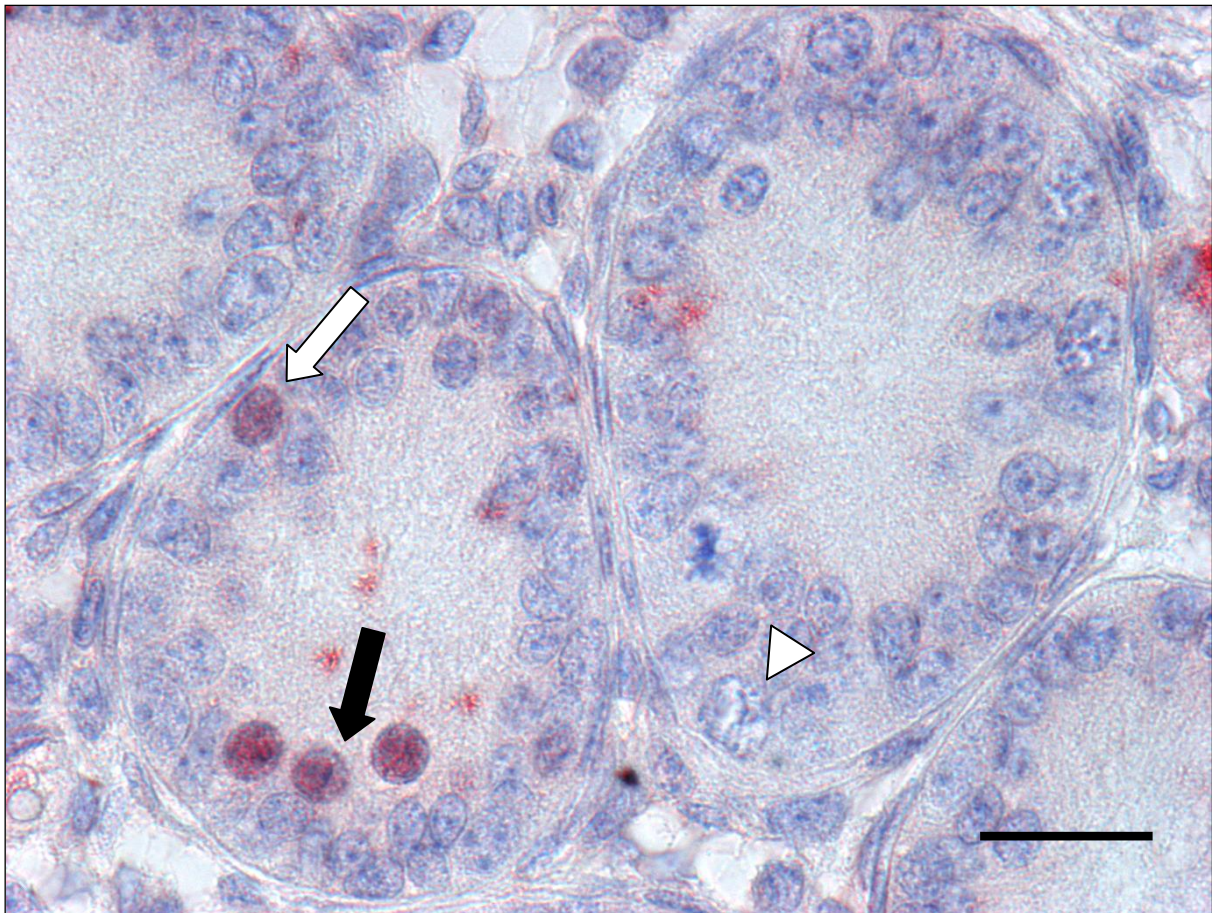
**Abbildung 40: Repräsentative Stra8-IHC einer WT-Maus.**

**In den WT-Tieren zeigen Spermatogonien (weißer Pfeil) und erste preleptotäne Spermatozyten (schwarzer Pfeil) eine starke Immunreaktion gegen Stra8. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20 μm.**



#### 3.9.4.2 SCCx43KO-Mäuse

Nur vereinzelt ist ein Immunsignal für Stra8 in den Keimsträngen der KO-Mäuse erkennbar (s.Abb.41).



**Abbildung 41: Repräsentative Stra8-IHC einer SCCx43KO-Maus.**

**Nur wenige Spermatogonien (weißer Pfeil) und preleptotäne Spermatozyten (schwarzer Pfeil) zeigen eine Farbreaktion, während der Großteil der basal gelegenen KZ immunonegativ bleibt (weiße Pfeilspitze). Der Messbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .**

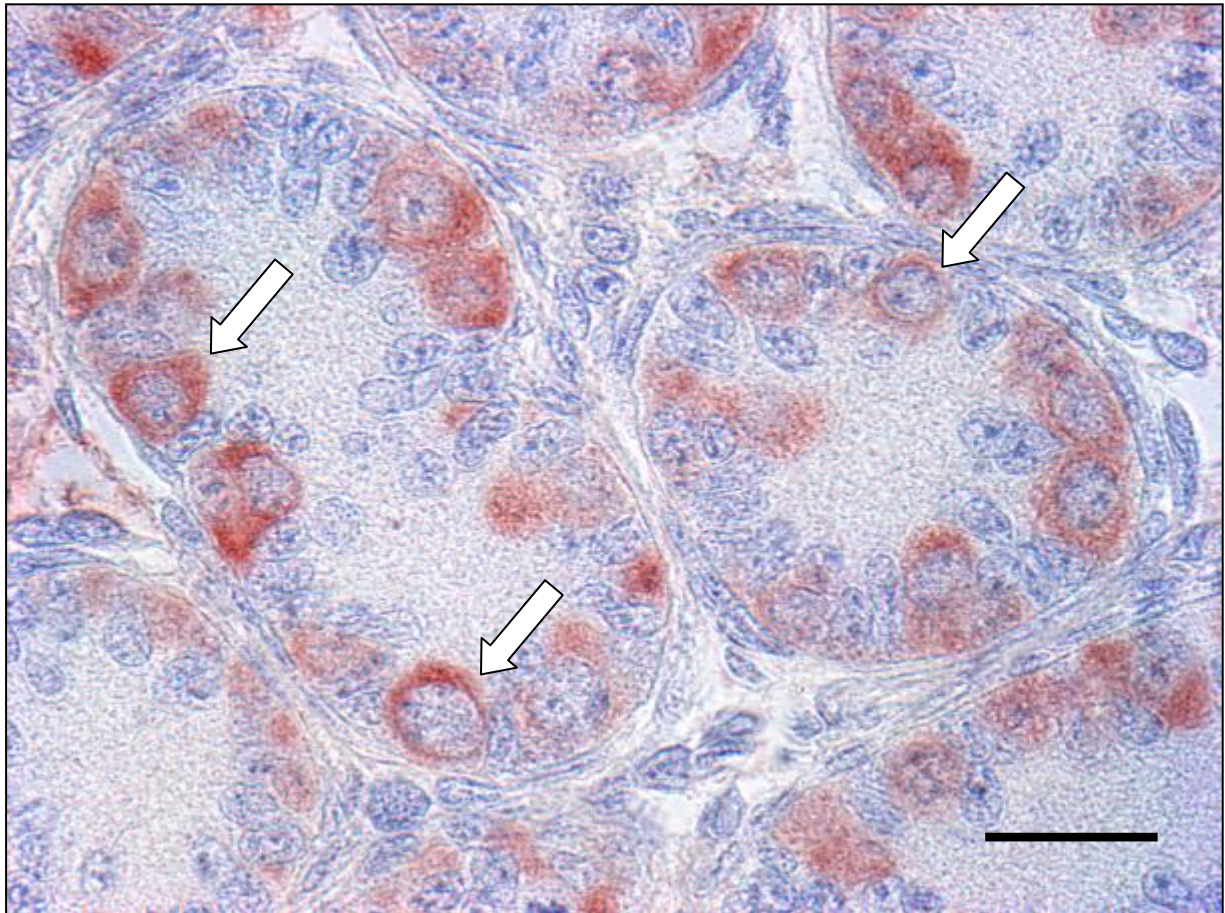
#### 3.9.5 Dazl-IHC

Auch in der Dazl-IHC konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Genotypen detektiert werden und bestätigte das Ergebnis aus dem Microarray-Experiment sowie der

qRT-PCR. Die Anzahl der Zellen, die eine Farbreaktion zeigen, ist in den KO-Tieren deutlich vermindert.

#### 3.9.5.1 WT-Mäuse

Eine hohe Anzahl KZ mit gefärbtem Zytoplasma ist innerhalb der Keimstränge erkennbar (s.Abb.42).



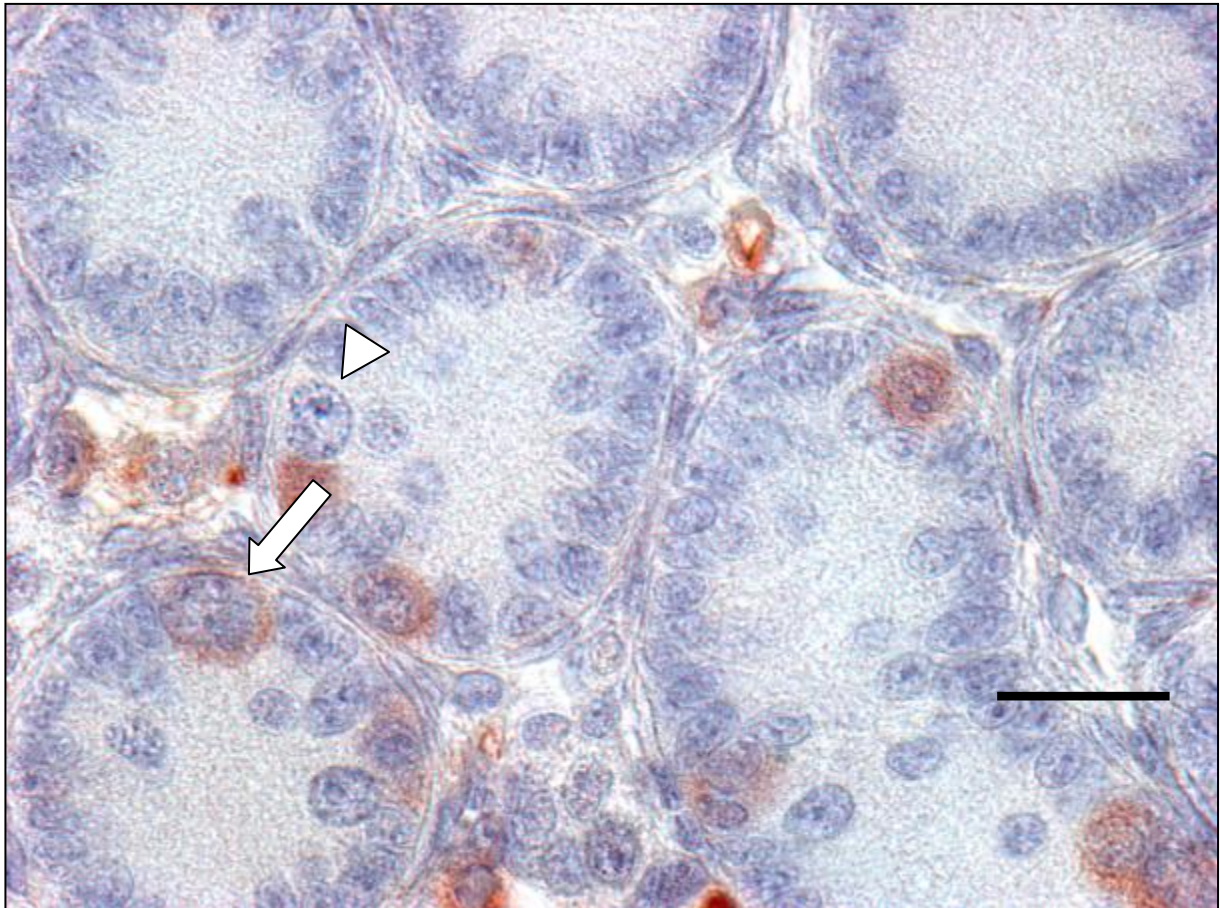
**Abbildung 42: Repräsentative Dazl-IHC einer WT-Maus.**

**Das Zytoplasma der KZ zeigt eine deutliche Färbung (weiße Pfeile). SZ und peritubuläre Zellen bleiben immunonegativ. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu$ m.**



### 3.9.5.2 SCCx43KO-Mäuse

Die Anzahl der in der Dazl-IHC gefärbten Zellen ist gegenüber derer in den WT-Mäusen reduziert (s.Abb.43).



**Abbildung 43: Repräsentative Dazl-IHC einer SCCx43KO-Maus.**

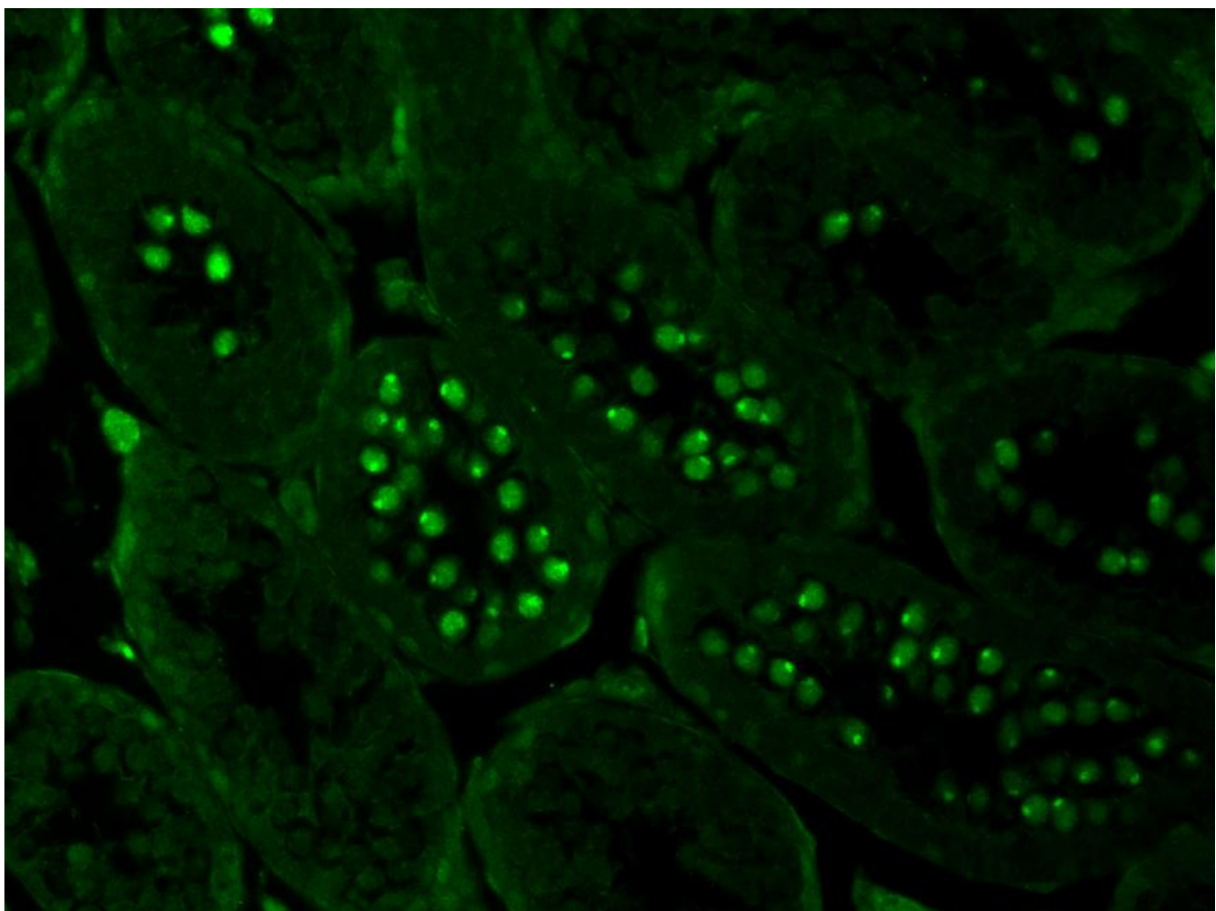
**Nur wenige Zellen zeigen eine zytoplasmatische Färbung. Vereinzelt sind auch KZ ohne immunopositives Signal sichtbar (weiße Pfeilspitze). SZ und peritubuläre Zellen bleiben immunonegativ. Der Messbalken entspricht einer Länge von 20 µm.**

### 3.10 IF von Dmrt7

Auch bei der gegen Dmrt7 gerichteten IF an Tag 15 p.p. ist ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennbar. Die Anzahl der Immunfluoreszenzsignale ist in den KO-Mäusen deutlich reduziert.

#### 3.10.1.1 WT-Mäuse

In einem Großteil der Keimtubuli ist eine Dmrt7-Immunreaktion in KZ detektierbar (s.Abb.44).



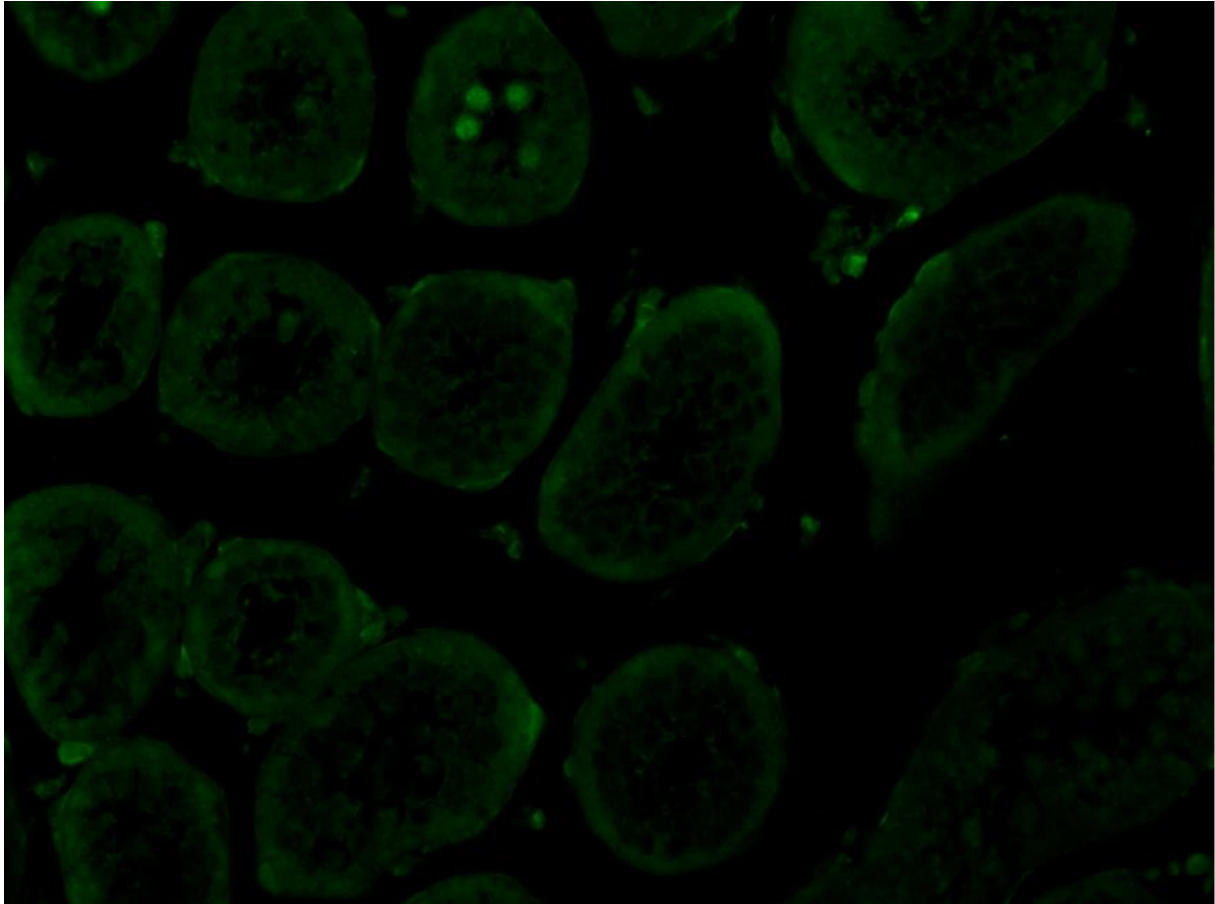
**Abbildung 44: Repräsentative Dmrt7-IF einer WT-Maus.**

In den untersuchten Schnitten der WT-Mäuse zeigten viele Keimtubuli ein Dmrt7-Fluoreszenzsignal in den pachytänen Spermatozyten. Daneben ist eine Anzahl von Tubulusquerschnitten sichtbar, in welchen kein Protein detektierbar ist (20ig-fache Vergrößerung).



### 3.10.1.2 SCCx43KO-Mäuse

Nur in wenigen Tubuli der SCCx43KO-Mäuse ist ein Fluoreszenzsignal für Dmrt7 detektierbar (s.Abb.45).



**Abbildung 45: Repräsentative Dmrt7-IF einer SCCx43KO-Maus.**

**Es sind nur einzelne gegen Dmrt7 gefärbte pachytäne Spermatozyten zu erkennen. Die übrigen Tubuli sind immunonegativ (20ig-fache Vergrößerung).**

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss die Deletion des Cx43-Gens in SZ auf die testikuläre Genexpression in der präpubertären Maus hat. Studien an Männern mit unterschiedlichen Störungen der Spermatogenese haben gezeigt, dass die jeweiligen phänotypischen Veränderungen oft mit einer veränderten Expression des Cx43-Gens einhergehen (Brehm et al. 2002; Defamie et al. 2003; Schleiermacher 1980; Steger et al. 1999b). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Gendeletionen bereits bei der Initiierung der Spermatogenese zu großen Veränderungen führen (Maratou et al. 2004). Die Bestätigung der existentiellen Wichtigkeit von Cx43 für eine funktionelle Spermatogenese konnte zusätzlich durch KO-Maus-Studien erbracht werden (Juneja et al. 1999; Plum et al. 2000). So zeichnen sich adulte SCCx43KO-Mäuse durch eine völlige Abstinenz von Spermien im Nebenhoden und eine veränderte Hodenmorphologie aus (Brehm et al. 2007; Sridharan et al. 2007b). Da die geänderte Hodenmorphologie und Zellzusammensetzung im Hoden adulter Tiere einen Genexpressionsvergleich erschweren und bereits Genexpressionsveränderungen zu einem früheren Zeitpunkt zu erwarten sind, wurden acht Tage alte Tiere für die Versuche ausgewählt. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Beginn der murinen Spermatogenese (Bellve et al. 1977).

Weiterhin soll diese Arbeit erste Aufschlüsse darüber geben, in welche Signalwege die veränderten Gene eingebunden sind und welche dieser Signalwege potentiell für den Phänotyp und die gestörte Spermatogenese im adulten Tier (mit)verantwortlich sind.

### 4.1 Einfluss der Cx43-Deletion in SZ auf die Zellzusammensetzung und Hodenmorphologie

#### 4.1.1 Einfluss der Cx43-Deletion auf die SZ-Zahl

Die Auswertung der HE-gefärbten Hodenschnitte an Tag acht p.p. zeigte, dass die Zahl der SZ noch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen aufweist. Im Gegensatz dazu konnten Brehm et al. und Sridharan et. al nachweisen, dass die Anzahl dieser Zellpopulation bei erwachsenen SCCx43KO-Tieren signifikant erhöht ist (Brehm et al. 2007; Sridharan et al. 2007b). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Amh-Proteinsynthese in SCCx43KO-Tieren gegenüber den WT-Tieren verlängert ist. Während bei WT-Tieren am Tag

17 p.p. kein Signal für Amh mehr detektierbar ist, bleibt das Protein bei SCCx43KO-Wurfgeschwistern bis einschließlich Tag 19 p.p. nachweisbar (Weider et al. 2011). Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen aus der vorliegenden qRT-PCR, die eine signifikant erhöhte Expression der Amh-mRNA zeigen konnte. Die Vermehrung der SZ verläuft bei Mäusen kontinuierlich. Sie beginnt in der fetalen Periode und endet drei Wochen nach der Geburt, wobei das Maximum der Zellzunahme zwei Tage vor der Geburt liegt (Orth 1982). In der Pubertät endet die mitotische Aktivität, die SZ machen ihre finale Reifung durch und ihre endgültige Zahl wird erreicht. Diese Tatsachen unterstützen die Vermutung von Sridharan et al., dass die SZ der SCCx43KO-Tiere ein Reserve- Proliferationskapazität besitzen (Sridharan et al. 2007a). Durch diese ist es ihnen möglich, dass anschließend an die Phase, in der die Hauptproliferation der SZ in den WT-Tieren abgeschlossen wurde, deren durchschnittliche Anzahl in den SCCx43KO-Tieren nicht nur erreicht, sondern sogar überschritten wird. Auch die stärkere Expression des Amh-Gens deutet darauf hin, dass die Differenzierung der SZ verzögert und damit deren Proliferationsphase eventuell verlängert ist.

#### 4.2 Einfluss der Cx43-Deletion auf die KZ-Zahl

Im Gegensatz zu der Anzahl der SZ ist die Zahl der KZ bereits am Tag acht p.p. signifikant verschieden. Während durchschnittlich drei KZ in jedem Keimstrangquerschnitt der WT-Mäuse zu finden sind, haben SCCx43KO-Tiere nur etwa eine KZ je Querschnitt. Diese Ergebnisse decken sich mit jenen, die bei der numerischen Auswertung von adulten SCCx43KO- und WT-Tieren gewonnen wurden (Brehm et al. 2007). Sie sind des weiteren konform mit denen, die man erhält, wenn man Hoden von generalisierten Cx43KO-Tieren postnatal unter die Nierenkapsel von WT-Tieren verpflanzt: Auch bei diesen kommt es nach der Geburt zu keiner weiteren Vermehrung der KZ-Population bei den homozygoten KO-Mäusen (Roscoe et al. 2001). Die durch die Auszählung der Keimstränge erhaltenen Zahlenwerte wurden genutzt, um die Genexpressionwerte der Microarray-Analyse um die unterschiedliche KZ-Zahl zu korrigieren. Zusammengefasst bestätigen diese Daten die wichtige Rolle der Kommunikation zwischen den SZ und KZ via Cx43 für die Differenzierung und Proliferation der KZ. Das Defizit in der KZ-Vermehrung wird auch im Laufe der Individualentwicklung nicht mehr aufgeholt (Brehm et al. 2007). Daraus kann geschlossen werden, dass das GJ-Protein Cx43 in den SZ eine unentbehrliche Rolle im

Keimepithel übernimmt, die nicht durch andere Cx oder Mechanismen kompensiert werden kann.

#### 4.3 Von der Cx43-Deletion betroffene Gene

Um die Frage zu klären, welche Gene durch die Deletion von Cx43 in ihrer Expression beeinflusst werden, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. Die Microarray-Analyse erbrachte, nach der Elimination von Ausreißern und der statistischen Auswertung, dass an Tag acht p.p. 658 Gene signifikant reguliert sind. 523 dieser Gene sind runterreguliert und 135 hochreguliert. Ähnliche Ergebnisse, was die Anzahl und Zeitpunkt der von der Deletion betroffenen Gene betrifft, konnten von anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls die Expression aller Gene eines Genoms zwischen KO- und WT-Tieren untersucht haben, gefunden werden. So führt der SZ-spezifische KO des Androgenrezeptors zu einem signifikanten Expressionsunterschied von 692 Genen in zehn Tage alten Tieren (Denolet et al. 2006). Auch bei Tieren, denen das Dazl-Gen fehlt, konnten Veränderungen in der Genexpression bereits sehr früh (an Tag fünf p.p.) detektiert werden (Maratou et al. 2004).

Diese Ergebnisse zeigen einerseits wie groß die Bedeutung des Cx43-Gens bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Ontogenese ist und andererseits, dass das Fehlen dieses Gens in den SZ sich vor allem hemmend auf die Expression anderer Gene auswirkt. Diese Daten zeigen des Weiteren, dass Cx43 von großer Bedeutung für die Stimulation der Transkription vieler Gene ist. Die physiologische Bedeutung der signifikant regulierten Gene wird durch die Tatsache untermauert, dass wenigstens 13 dieser Gene essentiell für eine funktionelle Spermatogenese sind (s.Tab.10; S.122).

#### 4.4 Funktionskategorien der signifikant regulierten Gene

Die signifikant regulierten Gene konnten Funktionskategorien zugeordnet werden. Zu den am stärksten vertretenen Kategorien, die mittels DAVID und SOURCE herausgefiltert werden konnten, gehören bei den hochregulierten Genen „Chemotaxis, Zellmigration und Zytoskelettorganisation“. Die Tatsache, dass auch ein großer Teil der herunterregulierten Gene der Abteilung Zellmigration zugeordnet werden konnte, gibt die bedeutende Rolle der GJ-vermittelten interzellulären Kommunikation für diese Funktion wieder. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die GJIC einen Einfluss auf die Zellmigration hat. Dieser

kann, je nach Modell, hemmend oder auch stimulierend sein (Ashton et al. 1999; Mori et al. 2006; Pollmann et al. 2005). Verschiedene Studien konnten des Weiteren den direkten Zusammenhang von Cx43 und verschiedenen Elementen des Zytoskeletts, wie z.B. Zo-1 und Tubulin nachweisen (Giepmans et al. 2001a; Giepmans et al. 2001b; Segretain et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Cx43 an alpha- und beta -Tubulin gleichwertig bindet. Dadurch wird eine mögliche Rolle des GJ-Proteins bei der Stabilisierung der Mikrotubuli benachbarter Zellen möglich (Giepmans et al. 2001b). Es ist erwiesen, dass zumindest ein Teil der Zellmigrations-Modulation über die Veränderung der Mikrotubulidynamik erreicht wird, was den Zusammenhang zwischen der Veränderung im Zytoskeletts und der Migration von Zellen unterstreicht (Francis et al. 2011). In diesem Zusammenhang, weisen die in dieser Studie gefundenen Veränderungen von Tubulin alpha 3 (Tuba3) (FC-4.5) und verschiedenen Keratin-Genen (Krt14, 17, 24 und 8) (FC von -2,11 bis -4,60) auf Störungen in der Zytoskelettdynamik hin. Bei den Funktionskategorien, die mittels GO-Analyse bei herunterregulierten Genen gefunden werden konnten, kommen noch die Abteilungen „Spermatogenese, Zellzyklus/Meiose, Transkription, Sexuelle Differenzierung und DNA-Modifikation & Translation“ hinzu, was die Bedeutung von Cx43 für diese Kategorien unterstreicht. Pelletier konnte in der Pubertät einen Zusammenhang zwischen dem Auftauchen des GJ-Proteins Cx43, der KZ-Differenzierung und der Modulation der SZ-Barriere herstellen (Pelletier 1995). Des Weiteren wird beim adulten Individuum die Synchronisation, Proliferation und Differenzierung der KZ über das GJ-Netzwerk vermittelt (Decrouy et al. 2004). Diese Gegebenheiten gemeinsam mit der Tatsache, dass adulte SCCx43KO-Mäuse eine gestörte Spermatogenese und Hodenmorphologie aufweisen, die sich in der Histologie in der Mehrzahl der Tubuli als SCO oder Spermatogonienarrest darstellt und daher keine Meiose stattfindet (Brehm et al. 2007), macht dieses Ergebnis wenig überraschend. Es bestätigt vielmehr die Bedeutung von Cx43 für die genannten Funktionsbereiche „Spermatogenese, Meiose und Sexuelle Differenzierung“ bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Initiierung der Spermatogenese.

#### 4.5 KZ-spezifische Gene der Spermatogenese

Überraschend ist das Ergebnis, dass der Großteil der veränderten Gene, die der Funktionskategorie Spermatogenese zugeordnet wurden, nicht SZ- sondern KZ-spezifisch sind. Erwartungsgemäß wäre ein großer Anteil von SZ-spezifischen Genen gewesen, da es

sich bei der in dieser Studie genutzten Mauselinie um einen SZ-spezifischen KO handelt. Dahingegen ist kein bekanntes Gen, welches spezifisch für diese Zellart ist, signifikant verändert. Im Gegensatz dazu konnten Abel und andere bei einem SZ-spezifischen KO des Androgenrezeptors an Tag acht p.p. von vierzehn getesteten SZ-spezifischen Transkripten fünf (Rhox5, Aqp8, Tjp1, Slc38a5, Gata1) als signifikant verändert identifizieren (Abel et al. 2008). Auch in der Histologie konnte beobachtet werden, dass der SCCx43KO sich stärker als erwartet auf die KZ auswirkt: Auch in den verbliebenen Spermatogonien wird kein Cx43-Protein mehr translatiert, wenn es in den SZ aufgrund des KO nicht mehr gebildet wird (Brehm et al. 2007). Bruzzone konnte zeigen, dass Cx43 in der Lage ist mit Cx37, Cx45 und Cx46 heterometrische GJ-Kanäle zu bilden (Bruzzone et al. 1996), wobei die Existenz dieser drei Cx-Proteine in den SZ bis heute nicht nachgewiesen werden konnte. Aus dem Verlust des Cx43-Proteins auf Seite der KZ kann daraus geschlossen werden, dass kein anderes Cx der SZ in der Lage ist, Cx43 zu ersetzen und mit dem Cx43 basierenden Connexon der KZ einen heteromeren Kanal zu bilden. Diese Gegebenheiten lassen vermuten, dass weniger das Gen Cx43 selbst für die Veränderungen in der Expression verantwortlich ist, als vielmehr die unterbrochene Kommunikation und der unterbrochene Fluss von Substanzen zwischen KZ und SZ. Als ersichtliche Folge dieser Hypothese ist die Tatsache zu sehen, dass primär die KZ durch die Deletion von Cx43 in ihrer Entwicklung beeinflusst werden und nur geringe Veränderungen die SZ selber betreffen (Weider et al. 2011). Diese These wird noch dadurch unterstützt, dass bekanntermaßen der Fluss von Substanzen zwischen SZ und KZ unidirektional ist, was bedeutet, dass der Substanzfluss nur gerichtet von SZ zur KZ stattfindet (Pointis et al. 2005; Risley et al. 2002).

**Tabelle 10: Übersicht über die signifikant regulierten, mit Spermatogenese assoziierten und KZ-spezifischen Gene und deren Bedeutung für die Spermatogenese.**

<b>Ovol1</b>	<b>Primäre &amp; sekundäre Spermatozyten</b>	(Dai et al. 1998)	Regulation der pachytänen Progression der KZ	(Li et al. 2005)

<b>Piwil2</b>	<b>Spermatogonien &amp; Spermatozyten</b>	(Kuramochi-Miyagawa et al. 2004)	Progression der Spermatogenese zwischen zygotänen und frühem pachytänen Stadium	(Kuramochi-Miyagawa et al. 2004)
<b>Sohlh1</b>	<b>Prä-spermatogonien, Spermatozyten</b>	(Ballow et al. 2006a)	Regulation der Spermatogoniendifferenzierung	(Ballow et al. 2006a)
<b>Lhx8</b>	<b>KZ</b>	(Pangas et al. 2006)	Mögliche Rolle in der Regulierung der Spermatogoniendifferenzierung	(Pangas et al. 2006)
<b>Dazl</b>	<b>Spermatogonien Typ B, Spermatozyten</b>	(Ruggiu et al. 1997)	Progression durch die meiotische Prophase/ KZ-Differenzierung	(Saunders et al. 2003)
<b>Stra8</b>	<b>Spermatogonien Typ A &amp; B, preleptotäne und frühe leptotäne Spermatozyten</b>	(Zhou et al. 2008)	Regulation der Initiierung der Meiose	(Anderson et al. 2008)
<b>Hnf1b</b>	<b>KZ</b>	(Reber und Cereghini 2001)	Homozygote vHNF1 Mäuse sterben vor der Gastrulation	(Reber und Cereghini 2001)
<b>Sox3</b>	<b>Spermatogonien</b>	(Raverot et al. 2005)	Differenzierung der Spermatogonien/ Initiierung, Progression der Meiose	(Raverot et al. 2005)
<b>Zpbp2</b>	<b>Spermien</b>	(Lin et al. 2007)	Morphologisch normale Spermienbildung/ Fertilität	(Lin et al. 2007)
<b>Taf7l</b>	<b>Spermatogonien, Spermatozyten, runde Spermatozyten</b>	(Cheng et al. 2007)	Entwicklung normaler Spermienanzahl und Beweglichkeit	(Cheng et al. 2007)
<b>Tex11</b>	<b>KZ</b>	(Wang et al. 2001)	Förderung der Initiierung und Erhaltung der Synapsis und des Crossing-over	(Yang et al. 2008)

<b>Ddx25</b>	<b>Spermatozyten &amp; Spermatiden</b>	(Gutti et al. 2008)	Post-transkriptionelle Kontrolle der Spermatogenese und Apoptosekontrolle in adulten Mäusen	(Gutti et al. 2008)
<b>Sycp2</b>	<b>KZ</b>	(Yang et al. 2006)	Formation der Synaptonemalen Komplexe während der Meiose	(Yang et al. 2006)

#### 4.6 Pathway-Analyse der signifikant regulierten Gene

Um die Frage zu klären, ob die signifikant regulierten Gene in Signalwege eingebunden sind, deren Beeinträchtigung zu einer Störung der Spermatogenese führen, wurde eine Pathway-Analyse durchgeführt. Die identifizierten, signifikant veränderten Gene konnten sieben Funktionsgruppen zugeteilt werden: „Sexuelle Differenzierung, Zellzyklus, Transkription, Synapsis, Immunantwort, Apoptose und Kohlenhydrat-Stoffwechsel“. Die Rolle von Cx43 in der sexuellen Differenzierung konnte mit verschiedenen KI- und KO-Modellen hinreichend bewiesen werden (Juneja et al. 1999; Plum et al. 2000). Beim erwachsenen Tier und Mann können Keimepithelzyklus-abhängige Veränderungen in der Cx-Expression detektiert werden (Batias et al. 2000; Tan et al. 1996). Batias konnte zeigen, dass ein gestörter Keimepithelzyklus zu einer veränderten Cx43-Expression führt (Batias et al. 1999). Des Weiteren ist eine Rolle von Cx43 in der Kontrolle des Zellzyklus bewiesen (Zhang et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es durch die Deletion von Cx43 zu einer Störung des Zellzyklus in KZ und SZ kommen kann. Da beim adulten Individuum des Weiteren die Synchronisation, Proliferation und Differenzierung der KZ über das GJ-Netzwerk vermittelt werden, ist auch die starke Zugehörigkeit der veränderten Gene zu den Funktionsgruppen „Transkription, Synapsis und Zellzyklus“ erwartungsgemäß (Decrouy et al. 2004). Warum mit der „Immunantwort und Apoptose“ assoziierte Gene verändert sind, lässt sich bislang nicht anhand des Phänotyps der SCCx43KO-Tiere erklären. In dem Fall der untersuchten SCCx43KO-Mäuse konnte auch die genaue Evaluation der Hodenschnitte verschiedener Altersklassen anhand der Morphologie keinen Hinweis auf eine vermehrte



Apoptose oder erhöhte Anzahl von immunaktiven Zellen bei den KO-Tieren erbringen. SZ stellen die Ammenzellen der KZ dar und versorgen sie mit den nötigen niedermolekularen Substanzen, Ionen und Signalen (Clermont 1993; Jegou 1993; Pelletier und Byers 1992). Diese Tatsache bietet einen möglichen Erklärungsansatz, warum viele der regulierten Gene der funktionellen Gruppe „Kohlenhydrat-Stoffwechsel“ zugeordnet werden können. Es ist denkbar, dass die KZ durch die gestörte Verbindung zu den SZ in einen „Hungerzustand“ geraten und daher die jeweiligen Gene (Aqp7, Slc37a2) verändert sind.

#### 4.7 Netzwerk-Analyse der signifikant regulierten Gene

Insgesamt konnten 25 Netzwerke identifiziert werden, in denen die signifikant regulierten Gene eine Rolle spielen. Zehn von diesen Netzwerken beinhalten neun oder mehr signifikant regulierte Gene. Bei keinem der Netzwerke ist es allerdings möglich, einen direkten oder offensichtlichen Zusammenhang zu der gestörten Spermatogenese oder zu dem Phänotyp der SCCx43KO-Tiere herzustellen. Zusätzlich fällt auf, dass Cx43 nur in ein Netzwerk direkt eingebunden ist. Die individuelle Kreation von Signalwegen konnte aber einen möglichen Zusammenhang zwischen dem „Retinoic acid mediated Apoptosis pathway“ und der Deletion von Cx43 zeigen. In dieses Netzwerk konnten zehn signifikant, meist runterreguliert Gene integriert werden (z.B.: Stra8, Crap1). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die automatische Kreation von Netzwerken kein hilfreiches Instrument zur Identifikation von Signalwegen ist, die zur gestörten Spermatogenese in den SCCx43KO-Mäusen führen. Dies kann durch die Tatsache bedingt sein, dass das Programm, welches zur Identifikation der Netzwerke genutzt wurde, nicht speziell Signalwege in den Keimdrüsen oder KZ detektiert, sondern vielmehr in allen Zellen und Organen des Körpers. Da Gene und ihre Produkte oft eine Zell- und Gewebe-spezifische Funktion in den Keimdrüsen haben, jedoch zusätzlich Funktionen in anderen Organen besitzen, werden meist letztere von dem Programm diesem Gen zugeordnet. Als Beispiel ist Piwil2 zu nennen, welches im Hoden KZ-spezifisch ist und für die Progression der KZ-Entwicklung über das zygotäne Stadium hinaus als essentiell ist (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004), jedoch von dem Programm der Funktion „Infektionskrankheiten, Genexpression und Antigenpräsentation“ zugeordnet wurde. Die Gegebenheit, dass kaum ein Zusammenhang zwischen den Netzwerken und Cx43 besteht, unterstützt die Vermutung, dass weniger das Cx43-Gen selbst, z.B. durch den Verlust als

Bindungspartner, für die Veränderungen in der Expression der Gene verantwortlich ist, als vielmehr die gestörte Kommunikation zwischen den KZ und SZ via Cx43.

#### 4.8 Canonical Pathway-Analyse der signifikant regulierten Gene

Von den insgesamt 212 Canonical Pathways, die signifikant regulierte Gene enthalten, erscheint lediglich ein Signalweg eine weitere Erkenntnis über die Art der Genexpressionsveränderung bei den SCCx43KO-Mäusen wiederzugeben. Dieser ist der "Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling"-Pathway mit den in ihm enthaltenen signifikant veränderten Genen: Cdkn2a, Gja1, Cdh1, Sfrp2, Wnt9b, Sox3, Tle3, Dkk2, Map4k1. Die übrigen Signalwege enthalten zwar ebenfalls signifikant veränderte Gene, jedoch ist dort kein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und diesen Signalwegen ersichtlich. Auch ist der "Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling"-Signalweg der einzige, in den Gja1 direkt eingebunden ist. Wie bei der „Netzwerkanalyse der signifikant regulierten Gene“ kann dies auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass nicht nur Hoden-spezifische Signalwege überprüft wurden und viele Gene noch zusätzliche Funktionen außerhalb des Keimepithels haben. Der „Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling“-Signalweg enthält neben Cx43 selbst auch das KZ-spezifische Gen Sox3, welches erwiesenermaßen von existentieller Bedeutung für die Spermatogenese ist (Raverot et al. 2005). Sox3 ist ein Mitglied der *high mobility group* (HMG) von Transkriptionsfaktoren und wird im Gehirn und den sich entwickelnden Keimdrüsen exprimiert. Die Familie der Sox-Gene wird durch die Homologie ihrer DNA bindenden Domäne zu der DNA-Bindungsdomäne von Sry, dem männlich-determinierenden Faktor definiert (Collignon et al. 1996). KO-Mäuse, denen das Sox3-Gen fehlt, zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie SCCx43KO-Tiere: In den Keimtubuli der Sox3KO-Mäuse finden sich überwiegend SZ und die wenigen KZ sind nur wenig differenziert. Neben den männlichen sind auch die weiblichen Tiere infertil (Raverot et al. 2005). Die Bedeutung, die Sox3 in der Spermatogenese besitzt, lässt die Vermutung zu, dass die verringerte Expression von Sox3, eventuell über den „Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling“-Signalweg, einen Anteil an dem observierten Phänotyp und der gestörten Spermatogenese in den adulten SCCx43KO-Tieren hat; was die eingangs gestellte Frage, ob es zwischen den veränderten Genen und dem observierten Phänotyp einen Zusammenhang gibt, beantwortet.

#### 4.9 Cx43 und die Blut-Hoden-Schranke

In der qRT-PCR zeigte sich, entsprechend der Daten aus der Microarray-Analyse, keine signifikante Regulierung von den mit der Bildung der Blut-Hoden-Schranke assoziierten Genen, mit Ausnahme von *Gja1*, welches erwartungsgemäß herunterreguliert war. Weiterhin zeigten zwei Cadherin-Subtypen (*Cdh1* & *Cdh15*) eine geringgradige Herunterregulierung. Andere Cadherine zeigten keine Veränderung in ihrer Expression. Auch in der IHC mit einem gegen Occludin gerichteten Antikörper konnte an Tag acht p.p. kein deutlicher Unterschied beobachtet werden. Bei Occludin handelt es sich um einen integralen Bestandteil der Blut-Hoden-Schranke und seine Deletion führt zur Infertilität bei den männlichen Tieren (Saitou et al. 2000). Interessanterweise sind im Gegensatz zu den acht Tage alten Tieren bei adulten SCCx43KO-Mäusen deutliche Veränderungen in der Expression von Blut-Hoden-Schranken-assoziierten Genen sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene auffindbar. Die Werte für Occludin, N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin sind erhöht, während die für Zo-1 erniedrigt sind (Carette et al. 2010). Die verschiedenen und essentiellen Funktionen, die die Blut-Hoden-Schranke zwischen den SZ mit Eintritt in die Pubertät übernimmt, lassen den Schluss zu, dass Veränderungen in dieser Barriere zu einer gestörten KZ-Entwicklung führen können (Kojic et al. 2009; Yao et al. 2010). Es gibt Hinweise darauf, dass die durch das GJ-Protein Cx43 vermittelte Zellkopplung einen Einfluss auf die Koordination der Durchlässigkeit der SZ-SZ-Verbindungskomplexe hat (Pelletier 1995). Versuche ergaben jedoch, dass die Funktion der Blut-Hoden-Schranke als Diffusionsbarriere durch die Deletion des Cx43-Gens nicht beeinflusst wird (Carette et al. 2010). Da an Tag acht p.p. auch noch keine signifikanten Unterschiede in der Blut-Hoden-Schranken-Bildung beobachtet werden können, ist eine Beteiligung jener Gene an dem observierten Phänotyp zu diesem Zeitpunkt eher unwahrscheinlich. Inwieweit die Expression der Blut-Hoden-Schranken-Gene und ihrer Proteine einen Einfluss auf die Hodenmorphologie und Funktion adulter SCCx43KO-Tiere hat, bedarf weiterer Nachforschungen (z.B. an Tag 10, 12, 14 p.p.).

#### 4.10 Retinsäure und Cx43

Obwohl sich an Tag acht p.p. keine morphologischen Anzeichen für Apoptose finden lassen, ist im „Retinoic acid mediated Apoptosis pathway“ ein Großteil der gefundenen Gene des Signalweges in der vorliegenden Studie signifikant reguliert. Darunter finden sich nicht die

Rezeptoren für Retinsäure oder die Retinsäure selbst, sondern unter anderem das Crabp1 (Cellular retinoic acid binding protein I) und Stra8 (Stimulated by retinoic acid gene 8). Mittels qRT-PCR konnte die Runterregulierung von Stra8 aus der Microarray-Analyse bestätigt werden. Die Immunfärbung von SCCx43KO- und WT-Tieren mit einem gegen Stra8 gerichteten Antikörper zeigte eine wesentlich geringere Anzahl immunopositiver Zellen im Hoden der KO-Tiere. Dies ist nicht alleine auf die Tatsache zurückzuführen, dass in den SCCx43KO-Tieren weniger KZ aufzufinden sind, da auch in einigen der vorhandenen KZ kein Stra8-Protein nachweisbar ist. Retinsäure (Retinoic acid) ist assoziiert mit einer funktionellen Spermatogenese und KZ-Entwicklung (Anderson et al. 2008). Diese Wirkung wird über sechs unterschiedliche, Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren vermittelt. Dazu gehören drei Retinsäure-Rezeptoren ( $RAR\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) und drei Retinoid X Rezeptoren (Zhou et al. 2008). Es ist zudem bewiesen, dass die Cx43-Expression durch Retinsäure stimuliert wird (Batias et al. 2000; Tanmahasamut und Sidell 2005; Vine und Bertram 2005), und dass die Deletion von  $RAR\alpha$  zu einer Störung der GJ-vermittelten Zellkopplung führt (Chung et al. 2009). Stra8 ist ein Wirbeltier-spezifischer Faktor, welcher von den KZ, durch Retinsäure stimuliert, exprimiert wird (Anderson et al. 2008). An Tag acht p.p. ist die Proteinexpression von Stra8 in den Typ A und B Spermatogonien und auch ersten leptotänen Spermatozyten lokalisiert (Zhou et al. 2008). Durch KO-Studien konnte die Bedeutung von Stra8 für eine funktionelle Spermatogenese gezeigt werden. Sowohl männliche als auch weibliche Stra8-defiziente Tiere sind infertil. Beim männlichen Individuum äußert sich dies durch ein Ausbleiben der Initiierung der Meiose, was eine Verhinderung des Eintritts in deren Prophase als Ursache hat (Anderson et al. 2008). Die starke Verbindung von Stra8 und Cx43 äußert sich in ähnlichen Regulationsmechanismen durch die Retinsäure, in der Vergleichbarkeit des Phänotyps der jeweiligen KO-Mäuse, der starken Beeinflussung des „Retinoic acid mediated Apoptosis pathway“-Signalweges durch den Cx43-KO und die Abhängigkeit der Stra8-Expression von Cx43. Zusammengefasst ist denkbar, dass die durch die Deletion des Cx43-Gens in SZ ausgelösten Genexpressionsveränderungen zu einer Störung des durch Retinsäure vermittelten Signalweges inklusive Stra8 geführt haben. Dies kann eine mögliche Ursache für den veränderten Phänotyp und die gestörte Spermatogenese der adulten SCCx43KO-Mäuse sein. Um diese Frage endgültig zu klären sind jedoch weitere Studien erforderlich. Möglich wäre eine gezielte Blockade von einzelnen Genen, welche in den SCCx43KO-Tieren signifikant reguliert sind, mittels siRNAs in WT-Mäusen, um so

genaueren Aufschluss über die Bedeutung der einzelnen Gen-Komponenten des Netzwerks zu bekommen.

#### 4.11 Cx43 und Dazl

Unter den signifikant regulierten Genen, die in der Microarray-Analyse identifiziert werden konnten, findet sich auch das Gen Dazl. Auch seine Runterregulierung konnte in der qRT-PCR bestätigt werden. Die IHC erbrachte ebenfalls den Nachweis, dass die Expression in den SCCx43KO-Tieren bedeutend geringer ist als in den WT-Tieren. In den Schnitten der Hoden der SCCx43KO-Mäuse ist eine deutlich kleinere Anzahl von KZ immunopositiv, wobei diese Tatsache nicht ausschließlich auf die insgesamt verminderte Spermatogonienzahl zurückzuführen ist. Dies lässt sich begründen durch das Ergebnis, dass unter den vorhandenen Spermatogonien der SCCx43KO-Tiere, auch vermehrt solche zu finden sind, die immunonegativ bleiben.

Bei Dazl handelt es sich um ein KZ-spezifisches Gen, dessen Protein vor allem im Zytoplasma von Typ B Spermatogonien gefunden werden kann und in einer geringeren Menge auch in pachytänen, preleptotänen und zygotänen Spermatozyten vorhanden ist (Ruggiu et al. 1997). Ähnlich wie bei Stra8 konnte auch für Dazl die existentielle Bedeutung für eine funktionelle Spermatogenese mittels KO-Studien bewiesen werden. Interessanterweise ist der Phänotyp des Dazl-KO der des SCCx43KO sehr ähnlich. In beiden Fällen sind die männlichen Tiere infertil, zeigen eine verminderte KZ-Zahl und einen Arrest der Spermatogenese, der den Eintritt der verbleibenden KZ in die meiotische Prophase verhindert (Brehm et al. 2007; Saunders et al. 2003). Auch für die Dazl-KO-Tiere wurde ein Microarray realisiert, der die Genexpression an Tag fünf und sieben p.p. mit der von WT-Tieren desselben Alters vergleicht (Maratou et al. 2004). Es konnten jedoch nur geringfügige Übereinstimmungen in den signifikant regulierten Genen zwischen den Arrays der beiden KO (DazlKO und SCCx43KO) gefunden werden. Lediglich zwei Gene waren in beiden Experimenten signifikant reguliert, namentlich Ovol1 und Nxf2. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich eher um eine synergistische Wirkung der Expressionsänderung des Gens Dazl und der Deletion von Cx43 handelt, als um einem gemeinsam genutzten Signalweg, welche zu der meiotischen Störung in den beiden Mäuselinien führt. Des Weiteren

deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die beiden Gene *Ovol1* und *Nxf2* eine bedeutende Rolle für die Entwicklung der KZ in der Phase der Meiose haben.

#### 4.12 Die Dm-Genfamilie und Cx43

Im Microarray-Experiment konnte *Dmrt6* und *Dmrt7* als signifikant herunter reguliert identifiziert und dieses Ergebnis durch die qRT-PCR bzw. IF bestätigt werden. Da bekannt ist, dass das Genfamilienmitglied *Dmrt7* essentiell für den ungestörten Ablauf der männlichen Meiose ist (Kim et al. 2007b), wurde die Proteinsynthese dieses Gens zwischen den SCCx43KO-Mäusen und WT-Tieren verglichen. Das Protein ist restriktiv nur in pachytänen Spermatozyten und Spermien detektierbar, so dass für diesen Versuch 15 Tage alte KO und WT-Tiere gewählt wurden. Mit Hilfe der IF konnte gezeigt werden, dass *Dmrt7* im Vergleich zu den WT-Tieren ebenfalls geringer in den SCCx43KO-Tieren exprimiert wird. Die wenigen immunopositiven Signale in den SCCx43KO-Mäusen können eventuell auf die 5% der Keimtubuli zurückgeführt werden, die Spermatogenese über die Meiose hinaus zeigen (Brehm et al. 2007). Die Dm (Dm=dsx und map-3)-Genfamilie kodiert eine hoch konservierte Familie von Transkriptionsfaktoren, welche in die sexuelle Differenzierung in wenigstens drei Phyla involviert ist (Murphy et al. 2007). Säugetiere exprimieren mindestens sieben DM-Domänen-Gene (*Dmrt1-7*) (Kim et al. 2003). *Dmrt1* ist essentiell für die sexuelle Differenzierung in Säugetieren (Raymond et al. 2000), während nur sehr wenige Informationen über *Dmrt6* erhältlich sind. Kim konnte eine sehr hohe Expression von *Dmrt2*, 5, 6, 7 in adulten Hoden beweisen (Kim et al. 2003). Basierend auf der Tatsache, dass zumindest zwei Mitglieder der *Dmrt*-Familie (*Dmrt6* und 7) eine verändertes Expressionsmuster zeigen, ist es möglich, dass diese Genfamilie einen Beitrag zu der gestörten Spermatogenese und dem KZ-Verlust der SCCx43KO-Tiere leistet. Die signifikante Verminderung der *Dmrt6* Expression an Tag acht p.p. könnte zudem eine mögliche Ursache für die Transkriptions- und Translationsveränderungen in älteren KO-Tieren darstellen.

#### 4.13 Weitere signifikant regulierte Gene und Cx43

Unter den signifikant regulierten Genen der Microarray-Analyse, die in der qRT-PCR bestätigt werden konnten, befinden sich auch *Sohlh1*, *Piwil2* und *Sycp2*. Bei *Sohlh1* (Spermatogenese und Oogenese spezifischer *basic helix-loop-helix* Transkriptions Faktor)

handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der als essentiell für eine funktionelle Spermatogenese identifiziert werden konnte (Ballow et al. 2006a). Sohlh1KO-Mäuse zeigen einen Arrest der Spermatogenese auf Stufe der Spermatogonien und seine Deletion führt, ähnlich wie bei dem in dieser Arbeit verwendeten konditionellen Maus-Modell, zu einer Unterbrechung der Spermatogonienentwicklung über frühe Stadien hinaus und zur Infertilität (Ballow et al. 2006a; Raverot et al. 2005). Die Deletion von Sycp2 und Piwil2 führt bei betroffenen Mäusen ebenfalls zur Sterilität, im Gegensatz zu den Sohlh1KO-Mäusen findet der Arrest der Spermatogenese allerdings zwischen dem zygotänen zum frühen pachytänen Stadium der Meiose statt (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Yang et al. 2006). Sycp2 (*Synaptonemal complex protein 2*) ist ein Gen, dessen Protein eine wichtige Rolle bei der Bildung der Synaptonemalen Komplexe in der Meiose spielt (Yang et al. 2006). Piwil2 (*piwi-like homolog 2=Mili*) ist eines von drei homologen Mausgenen zum Piwi-Gen. Mitglieder der Piwi-Genfamilie spielen eine Rolle in der Stammzellselbsterneuerung, der RNA-Inaktivierung und Translationsregulierung (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Lee et al. 2006). Ein Effekt der Runterregulierung der genannten Gene auf die Spermatogenese und KZ-Entwicklung ist also denkbar. Bemerkenswert ist weiterhin, dass es sich bei allen drei Genen sowie bei Sohlh1, wie bereits zuvor erwähnt, um KZ-spezifische Gene handelt (Ballow et al. 2006a; Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Yang et al. 2006). Dies betont nochmals die Bedeutung der von SZ gebildeten und auf Cx43 basierenden, GJ-vermittelten Kommunikation zwischen KZ und SZ.

Die Daten zeigen, dass bereits an Tag acht p.p. deutliche morphologische und Genexpressions-Unterschiede detektierbar sind. Viele der veränderten Gene konnten als essentiell für die KZ-Entwicklung und Initiierung der Spermatogenese identifiziert werden, was für sie eine mögliche Rolle in der Entwicklungsstörung der adulten SCCx43KO-Mäuse und der gestörten Initiierung der Spermatogenese annehmen lässt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Hinweise auf eine Rolle der „frühen“ Blut-Hoden-Schranke bei der Entwicklung des adulten Phänotyps zum untersuchten Zeitpunkt (Tag acht p.p.) gefunden werden. Der observierte Phänotyp scheint eher eine Folge der gestörten KZ-SZ-Kommunikation zu sein. Diese Annahme wird durch den hohen Anteil von signifikant regulierten, KZ-spezifischen Genen unterstützt, sowie durch die Ergebnisse, dass keine SZ-spezifischen Gene verändert sind und dass in keinen der veränderten Signalwege Cx43 direkt eingebunden ist.

Weitere Studien, die die Genexpression von SCCx43KO und WT-Tieren während der ersten Spermatogenesewellen an d10, d12 und d14, d21 vergleichen sollen, werden weitere Einblicke in die Ursachen der Spermatogenesestörungen geben. Durch Untersuchung der Genexpressionsunterschiede an Tag sechs p.p. können zusätzliche Informationen gewonnen werden, ob bereits vor dem Auftreten von Typ B Spermatogonien in den Keimsträngen Veränderungen detektierbar sind.



## 5 Zusammenfassung

Connexine (Cx) sind die Proteinuntereinheiten der Gap Junction (GJ)-Kanäle. Sie werden von nahezu allen differenzierten Zellen des Körpers exprimiert. Durch die durch sie gebildeten Kanäle können Ionen, niedermolekulare Substanzen und Transmitter in die benachbarten Zellen gelangen. Dieser Stoffaustausch via Cx-geformter GJ ermöglicht die direkte Kommunikation und Koordination der Zellen eines Verbundes. Im Hoden ist Cx43 das vorherrschende GJ-Protein. Mäuse, denen das genannte Cx43-Gen nur in den Sertoli Zellen (SZ) des Hoden fehlt, sind lebensfähig aber infertil. Erwachsene Tiere zeigen eine stark veränderte Hodenmorphologie. Bei einer großen Zahl von SZ finden sich nur sehr wenige Keimzellen (KZ). Am Tag acht nach der Geburt wird die Spermatogenese bei Mäusen initiiert. Des Weiteren ist zu diesem Zeitpunkt die Morphologie des Hodens zwischen SCCx43KO-Mäusen und WT-Tieren grundsätzlich vergleichbar. Aus genannten Gründen wurde daher dieses Alter gewählt, um die vorliegende Studie durchzuführen.

In der Arbeit wurde die Morphologie der acht Tage alten Keimdrüsen beider Genotypen analysiert und einander gegenübergestellt. Mit Hilfe der Microarray-Analyse konnte die Genexpression im Hoden der beiden Mäusestämme verglichen werden. Die Ergebnisse der Microarray-Untersuchung wurden mittels qRT-PCR verifiziert und ergänzt. Durch eine Pathway-Analyse konnten die signifikant regulierten Gene Signalwegen, Netzwerken und Canonical Pathways zugeordnet werden. Um zu überprüfen, ob sich die Veränderungen auf RNA-Ebene auch auf Proteinebene widerspiegeln, wurden für ausgewählte Gene Immunohistochemie (IHC) und Immunofluoreszenz (IF) durchgeführt.

In den Hoden der acht Tage alten SCCx43KO-Tiere konnte eine deutlich geringere Anzahl von KZ als in den WT-Vergleichstieren detektiert werden. Hingegen ist kein Unterschied in der Morphologie und der Anzahl der SZ zu finden. Dies macht die Bedeutung von Cx43 für die KZ-Entwicklung deutlich, da auch bei adulten KO-Tieren ihre Anzahl reduziert ist und ihre Entwicklung nicht fortschreitet. Auf der anderen Seite lässt die bei adulten SCCx43KO-Mäusen erhöhte Zahl von adulten SZ je Keimtubulus in Zusammenhang mit einer erhöhten Amh-Expression an Tag acht p.p. auf eine verlängerte Proliferationsphase der SZ-Population schließen. In der Microarray-Analyse konnten 658 Gene als signifikant reguliert identifiziert werden: 135 von ihnen waren herauf- und 523 herunterreguliert. Die Pathway-Analyse zeigte,

dass die veränderten Netzwerke und Signalwege zum allergrößten Teil nicht direkt mit Cx43 in Verbindung stehen. Unter den signifikant veränderten Genen fiel ein sehr großer Anteil KZ-spezifischer Gene auf. Auch nach Korrektur der Genexpressionsunterschiede um den Faktor ( $1/\phi_{\text{KZ-Zahl}}$ ), den man durch die numerische Auswertung der Zellpopulationen im Hoden beider Genotypen erhalten hat, bleiben die Veränderungen signifikant. Zu diesen Genen zählten unter anderem Dazl, Stra8, Sox3 und Ovol1. Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die Deletion des Cx43-Gens in erster Linie Auswirkungen auf die KZ-Population hat, die von den SZ ernährt und gestützt wird. Ein weiteres Indiz ist durch die CX43-IHC gegeben. Sie zeigt, dass auch KZ kein Cx43-Protein zu translatieren scheinen, wenn kein Cx43-Connexon von den SZ bereitgestellt wird. Dies deutet darauf hin, dass kein anderes Cx in SZ in der Lage ist, mit Cx43 der KZ GJ-Kanäle zu bilden und somit deren Funktion nicht kompensiert werden kann. Zu dem untersuchten Zeitpunkt konnten praktisch keine Veränderungen der mit der Blut-Hoden-Schranke assoziierten Gene (z.B. Occludin), mit Ausnahme von Cx43 selbst, gefunden werden. Dadurch erscheint eine Rolle dieser Gene bei dem gefundenen, adulten Phänotyp zu diesem Zeitpunkt eher unwahrscheinlich. Mehrere signifikant regulierte Gene wie z.B. Stra8, Sox3 und Dazl konnten als essentiell für eine funktionelle Spermatogenese identifiziert werden und kommen somit als mögliche Mitverursacher des KZ-Defizits und der Spermatogenesestörungen in adulter SCCx43KO-Tiere in Betracht. Vergleichende Untersuchungen an humanen Hodenbiopsien mit verschiedenen Spermatogenesestörungen könnten zu weiteren Erkenntnissen beitragen.

## 6 Summary

Connexins (Cx) are expressed by nearly all differentiated cell types. They permit an exchange of ions, metabolites and signalling molecules. These exchanges via Connexin-formed Gap junctions allow the direct communication and coordination of cells within a tissue. In the testis Cx43 is the predominantly expressed gap junction protein. Mice lacking the Cx43-gene in Sertoli cells (SC) are viable but infertile. Adult animals show a severely altered testicular morphology with only a few differentiated germ cells and an increased number of SC. In mice, the initiation of spermatogenesis starts at about day eight p.p.. Furthermore, at that age the morphology of the testis is still comparable between SC-specific Cx43-knockout (KO)-mice and wild-type-mice. Therefore animals of this age were used for the present study.

In this survey, morphology of the gonads at eight day old wild-type- and SCCx43KO-mice was analysed and compared. By Microarray analysis the gene expression in the testes of both genotypes were compared. The results of the Microarray analysis were verified and supplemented using qRT-PCR. Using Pathway analysis, significantly regulated genes could be assigned to Signalling pathways, networks and Canonical pathways. To test whether the alterations on mRNA-level are reflected on protein-level, Immunohistochemistry (IHC) and Immunofluorescence were performed.

Results show, that the number of germ cells at day eight p.p. is reduced in the SCCx43KO-mice compared to the wild-type littermates. In contrast, there is no difference concerning the morphology and number of SC. On the one hand this result proves the importance of Cx43 for germ cell development. On the other hand the increased number of SC in adult KO-mice concomitant with a higher Amh-expression in the present study and a prolonged time of Amh-expression in a former study points to alterations in SC maturation and proliferation. In the Microarray analysis 658 genes were identified as significantly regulated; 135 of them were up-regulated, while 523 were down-regulated. Pathway analysis showed that only very few of the signalling pathways and networks are directly correlated with Cx43. Furthermore a very high percentage of germ cell-specific genes were detectable among the significantly regulated genes like Dazl, Stra8, Sox3 and Ovol1. They kept to be significantly regulated even after the adjustment by the differing number of germ cells using a correction factor ( $1/\varnothing_{\text{germ cell number}}$ ). These findings permit the conclusion that the deletion of Cx43 primarily effects the germ cell

population, which is supported by the nursing SC. Evidence maybe given by the Cx43-IHC in adult SCCx43KO-mice, as there the germ cells seem not to be able to translate Cx43-protein, if there is no Cx43-connexon provided by the SC. This leads to the conclusion that there is no other Cx in SC being able to form functional gap junction-channels with the Cx43-connexons of the germ cells (and vice versa). Therefore the function of Cx43 cannot be compensated or replaced. At the time of development investigated in this study almost no alterations in genes involved in the formation of the blood-testis-barrier, apart from Cx43 itself, could be observed. Several significantly regulated genes, for example Stra8, Sox3 and Dazl could be detected as candidate genes which may be involved in the observed germ cell deficiency and disturbance of functional spermatogenesis in adult SCCx43KO-mice. Comparative studies of these genes using human testicular biopsies with different kinds of impaired spermatogenesis might be able to provide further information.

## 7 Literaturverzeichnis

Abel, M. H., Baker, P. J., et al. (2008). "Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen." Endocrinology **149**(7): 3279-85.

Ahne, W. (2000). Zoologie : Lehrbuch für Studierende der Veterinärmedizin und Agrarwissenschaften. Stuttgart, Schattauer.

Alberts, B., Johnson, A., et al. (2011). Zellverbindungen, Zelladhäsion und die extrazelluläre Matrix. Molekularbiologie der Zelle. Jaenicke, L. Weinheim, WILEY-VCH. **5**.

Anderson, C. L., Zundel, M. A., et al. (2005). "Variable promoter usage and alternative splicing in five mouse connexin genes." Genomics **85**(2): 238-44.

Anderson, E. L., Baltus, A. E., et al. (2008). "Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14976-80.

Aravindakshan, J. and Cyr, D. G. (2005). "Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway." Biol Reprod **72**(5): 1232-40.

Ashton, A. W., Yokota, R., et al. (1999). "Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A(2)." J Biol Chem **274**(50): 35562-70.

Ballow, D., Meistrich, M. L., et al. (2006a). "Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation." Dev Biol **294**(1): 161-7.

Ballow, D. J., Xin, Y., et al. (2006b). "Sohlh2 is a germ cell-specific bHLH transcription factor." Gene Expr Patterns **6**(8): 1014-8.

Batias, C., Defamie, N., et al. (1999). "Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis." Cell Tissue Res **298**(1): 113-21.

Batias, C., Siffroi, J. P., et al. (2000). "Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium." J Histochem Cytochem **48**(6): 793-805.

Battke, F., Symons, S., et al. (2010). "Mayday--integrative analytics for expression data." BMC Bioinformatics **11**: 121.

Bellve, A. R., Cavicchia, J. C., et al. (1977). "Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization." J Cell Biol **74**(1): 68-85.

Bennett, M. V., Barrio, L. C., et al. (1991). "Gap junctions: new tools, new answers, new questions." Neuron **6**(3): 305-20.

Bergmann, M. (2006). Physiology of Spermatogenesis. Andrology for the Clinician. Schill, W. B., Comhaire, F. H. et al. (Hrsg.). Heidelberg, Springer-Verlag: 272-280.

Beyer, E. C., Goodenough, D. A., et al. (1988). The connexins, a family of related gap junction proteins. Gap Junctions. Hertzberg, E. L. and Johnson, R. C. New York, Alan R. Liss Inc.: 167-175.

Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., et al. (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." Bioinformatics **19**(2): 185-93.

Boujrad, N., Hochereau-de Reviers, M. T., et al. (1995). "Evidence for germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat." Biol Reprod **53**(6): 1345-52.

Bravo-Moreno, J. F., Diaz-Sanchez, V., et al. (2001). "Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development." Anat Rec **264**(1): 13-24.

Brehm, R., Marks, A., et al. (2002). "Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma." J Pathol **197**(5): 647-53.

Brehm, R. and Steger, K. (2005). Regulation of Sertoli Cell and Germ Cell Differentiation. Heidelberg, Springer Verlag.

Brehm, R., Zeiler, M., et al. (2007). "A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis." Am J Pathol **171**(1): 19-31.

Breitling, R., Armengaud, P., et al. (2004). "Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments." FEBS Lett **573**(1-3): 83-92.

Breitling, R. and Herzyk, P. (2005). "Rank-based methods as a non-parametric alternative of the T-statistic for the analysis of biological microarray data." J Bioinform Comput Biol **3**(5): 1171-89.

Bremner, W. J., Millar, M. R., et al. (1994). "Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens." Endocrinology **135**(3): 1227-34.

Bruzzone, R., White, T. W., et al. (1996). "Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling." Eur J Biochem **238**(1): 1-27.

- Busch, W. and Zerbobin, K. (1995). Fruchtbarkeitskontrolle bei Groß- und Kleintieren. Jena, Fischer Verlag.
- Butterweck, A., Elfgang, C., et al. (1994). "Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin." Eur J Cell Biol **65**(1): 152-63.
- Calera, M. R., Topley, H. L., et al. (2006). "Connexin43 is required for production of the aqueous humor in the murine eye." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4510-9.
- Carette, D., Weider, K., et al. (2010). "Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility." Dev Biol **346**(1): 54-67.
- Carystinos, G. D., Kandouz, M., et al. (2003). "Unexpected induction of the human connexin 43 promoter by the ras signaling pathway is mediated by a novel putative promoter sequence." Mol Pharmacol **63**(4): 821-31.
- Caspar, D. L., Goodenough, D. A., et al. (1977). "Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction." J Cell Biol **74**(2): 605-28.
- Cheng, C. Y. and Mruk, D. D. (2002). "Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development." Physiol Rev **82**(4): 825-74.
- Cheng, Y., Buffone, M. G., et al. (2007). "Abnormal sperm in mice lacking the Taf7l gene." Mol Cell Biol **27**(7): 2582-9.
- Chung, S. S., Choi, C., et al. (2009). "Aberrant distribution of junctional complex components in retinoic acid receptor alpha-deficient mice." Microsc Res Tech.
- Clermont, Y. (1963). "The cycle of the seminiferous epithelium in man." Am J Anat **112**: 35-51.
- Clermont, Y. (1993). Introduction to the Sertoli Cell. The Sertoli Cell. Griswold, M. D. and Russel, L. D. Clearwater, Cache River Press.
- Cocquet, J., Ellis, P. J., et al. (2010). "Deficiency in the multicopy Sycp3-like X-linked genes Slx and Slx1l causes major defects in spermatid differentiation." Mol Biol Cell **21**(20): 3497-505.
- Collignon, J., Sockanathan, S., et al. (1996). "A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2." Development **122**(2): 509-20.
- Comhaire, F. and Mahmoud, A. (2006). Endocrine Regulation. Andrology for the Clinician. Schill W.B., Comhaire F.H. et al. (Hrsg.). Heidelberg, Springer Verlag: 288-290.
- Connolly, C. M., Dearth, A. T., et al. (2005). "Disruption of murine Tenr results in teratospermia and male infertility." Dev Biol **278**(1): 13-21.

Dai, X., Schonbaum, C., et al. (1998). "The ovo gene required for cuticle formation and oogenesis in flies is involved in hair formation and spermatogenesis in mice." Genes Dev **12**(21): 3452-63.

Darrow, B. J., Laing, J. G., et al. (1995). "Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes." Circ Res **76**(3): 381-7.

de Feijter, A. W., Matesic, D. F., et al. (1996). "Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells." Mol Carcinog **16**(4): 203-12.

Decrouy, X., Gasc, J. M., et al. (2004). "Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis." J Cell Physiol **200**(1): 146-54.

Defamie, N., Mograbi, B., et al. (2001). "Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells." Carcinogenesis **22**(9): 1537-42.

Defamie, N., Berthaut, I., et al. (2003). "Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells." Lab Invest **83**(3): 449-56.

Del Castillo, E. B., Trabucco, A., et al. (1947). "Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells." J Clin Endocrinol Metab **7**(7): 493-502.

Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., et al. (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery." Genome Biol **4**(5): P3.

Denolet, E., De Gendt, K., et al. (2006). "The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice." Mol Endocrinol **20**(2): 321-34.

Diehn, M., Sherlock, G., et al. (2003). "SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data." Nucleic Acids Res **31**(1): 219-23.

Dym, M. and Fawcett, D. W. (1970). "The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium." Biol Reprod **3**(3): 308-26.

Elliott, D. J., Millar, M. R., et al. (1997). "Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3848-53.

Fallon, R. F. and Goodenough, D. A. (1981). "Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein." J Cell Biol **90**(2): 521-6.

Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., et al. (2004). "Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants." Reprod Toxicol **18**(3): 413-21.



Fischer, P., Brehm, R., et al. (2005). "Connexin 33: a rodent-specific member of the gap junction protein family?" J Androl **26**(1): 75-84.

Francis, R. and Lo, C. W. (2006). "Primordial germ cell deficiency in the connexin 43 knockout mouse arises from apoptosis associated with abnormal p53 activation." Development **133**(17): 3451-60.

Francis, R., Xu, X., et al. (2011). "Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics." PLoS One **6**(10): e26379.

Gabriel, H. D., Jung, D., et al. (1998). "Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice." J Cell Biol **140**(6): 1453-61.

Geimonen, E., Boylston, E., et al. (1998). "Elevated connexin-43 expression in term human myometrium correlates with elevated c-Jun expression and is independent of myometrial estrogen receptors." J Clin Endocrinol Metab **83**(4): 1177-85.

Giepmans, B. N., Verlaan, I., et al. (2001a). "Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules." Curr Biol **11**(17): 1364-8.

Giepmans, B. N., Verlaan, I., et al. (2001b). "Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin." Cell Commun Adhes **8**(4-6): 219-23.

Godmann, M., Katz, J. P., et al. (2008). "Kruppel-like factor 4 is involved in functional differentiation of testicular Sertoli cells." Dev Biol **315**(2): 552-66.

Gondos, B. and Berndston, W. E. (1993). Postnatal and Pubertal Development. The Sertoli Cell. Russel, L. D. and Griswold, M. D. St. Louis, Cache River Press: 115-154.

Griswold, M. D. (1995). "Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis." Biol Reprod **52**(2): 211-6.

Gutstein, D. E., Morley, G. E., et al. (2001). "Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43." Circ Res **88**(3): 333-9.

Gutti, R. K., Tsai-Morris, C. H., et al. (2008). "Gonadotropin-regulated testicular helicase (DDX25), an essential regulator of spermatogenesis, prevents testicular germ cell apoptosis." J Biol Chem **283**(25): 17055-64.

Gwadry, F. G., Sequeira, A., et al. (2005). "Molecular characterization of suicide by microarray analysis." Am J Med Genet C Semin Med Genet **133C**(1): 48-56.

Haeffliger, J. A., Bruzzone, R., et al. (1992). "Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping." J Biol Chem **267**(3): 2057-64.

Herve, J. C., Pluciennik, F., et al. (1996). "Influence of the molecular structure of steroids on their ability to interrupt gap junctional communication." J Membr Biol **149**(3): 179-87.

Hirai, A., Yano, T., et al. (2003). "Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell." Am J Nephrol **23**(3): 172-7.

Hoei-Hansen, C. E., Holm, M., et al. (2003). "Histological evidence of testicular dysgenesis in contralateral biopsies from 218 patients with testicular germ cell cancer." J Pathol **200**(3): 370-4.

Holstein, A. F., Roosen-Runge, E. C., et al. (1988). Histology of Altered Spermatogenic and Interstitial Tissue. Illustrated pathology of human spermatogenesis. Berlin, Grosse Verlag.

Houghton, F. D., Thonnissen, E., et al. (1999). "Doubly mutant mice, deficient in connexin32 and -43, show normal prenatal development of organs where the two gap junction proteins are expressed in the same cells." Dev Genet **24**(1-2): 5-12.

Hu, W., Gauthier, L., et al. (2010). "FIGLA, a basic helix-loop-helix transcription factor, balances sexually dimorphic gene expression in postnatal oocytes." Mol Cell Biol **30**(14): 3661-71.

Hudder, A. and Werner, R. (2000). "Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene." J Biol Chem **275**(44): 34586-91.

Hurtley, S. M. and Helenius, A. (1989). "Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Cell Biol **5**: 277-307.

Ikawa, M., Tokuhiro, K., et al. (2011). "Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility." J Biol Chem **286**(7): 5639-46.

Inoue, N., Hess, K. D., et al. (1999). "New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis." Hum Mol Genet **8**(7): 1201-7.

Jegou, B. (1993). "The Sertoli-germ cell communication network in mammals." Int Rev Cytol **147**: 25-96.

Jordan, K., Chodock, R., et al. (2001). "The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization." J Cell Sci **114**(Pt 4): 763-73.

Josso, N., Lamarre, I., et al. (1993). "Anti-mullerian hormone in early human development." Early Hum Dev **33**(2): 91-9.

Juneja, S. C., Barr, K. J., et al. (1999). "Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43." Biol Reprod **60**(5): 1263-70.

Juneja, S. C. (2003). "mRNA expression pattern of multiple members of connexin gene family in normal and abnormal fetal gonads in mouse." Indian J Physiol Pharmacol **47**(2): 147-56.

- Kahiri, C. N., Khalil, M. W., et al. (2006). "Leydig cell function in mice lacking connexin43." Reproduction **132**(4): 607-16.
- Kim, K. Y., Kim, B. J., et al. (2004). "Reuse of imputed data in microarray analysis increases imputation efficiency." BMC Bioinformatics **5**: 160.
- Kim, S., Kettlewell, J. R., et al. (2003). "Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad." Gene Expr Patterns **3**(1): 77-82.
- Kim, S., Bardwell, V. J., et al. (2007a). "Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation." Dev Biol **307**(2): 314-27.
- Kim, S., Namekawa, S. H., et al. (2007b). "A mammal-specific Doublesex homolog associates with male sex chromatin and is required for male meiosis." PLoS Genet **3**(4): e62.
- Kirchhoff, S., Kim, J. S., et al. (2000). "Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice." Circ Res **87**(5): 399-405.
- Kluin, P. M., Kramer, M. F., et al. (1984). "Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice." Anat Embryol (Berl) **169**(1): 73-8.
- Komljenovic, D., Sandhoff, R., et al. (2009). "Disruption of blood-testis barrier dynamics in ether-lipid-deficient mice." Cell Tissue Res **337**(2): 281-99.
- Kraif, U., Wermke, M., et al. (2011). Duden - das Fremdwörterbuch : auf der Grundlage der aktuellen amtlichen Rechtschreibregeln. Mannheim Dudenverl.
- Kruger, O., Plum, A., et al. (2000). "Defective vascular development in connexin 45-deficient mice." Development **127**(19): 4179-93.
- Kumai, M., Nishii, K., et al. (2000). "Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis." Development **127**(16): 3501-12.
- Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1996). "The gap junction communication channel." Cell **84**(3): 381-8.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., et al. (2004). "Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis." Development **131**(4): 839-49.
- Lecureuil, C., Fontaine, I., et al. (2002). "Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice." Genesis **33**(3): 114-8.
- Lee, J. H., Engel, W., et al. (2006). "Stem cell protein Piwil2 modulates expression of murine spermatogonial stem cell expressed genes." Mol Reprod Dev **73**(2): 173-9.
- Li, B., Nair, M., et al. (2005). "Ovol1 regulates meiotic pachytene progression during spermatogenesis by repressing Id2 expression." Development **132**(6): 1463-73.

- Li, C. and Wong, W. H. (2001). "Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 31-6.
- Lin, Y. N., Roy, A., et al. (2007). "Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis." Mol Cell Biol **27**(19): 6794-805.
- Linhares, V. L., Almeida, N. A., et al. (2004). "Transcriptional regulation of the murine Connexin40 promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5." Cardiovasc Res **64**(3): 402-11.
- Lo, C. W., Waldo, K. L., et al. (1999). "Gap junction communication and the modulation of cardiac neural crest cells." Trends Cardiovasc Med **9**(3-4): 63-9.
- Lock, C., Hermans, G., et al. (2002). "Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis." Nat Med **8**(5): 500-8.
- Loring, J. F., Wen, X., et al. (2001). "A gene expression profile of Alzheimer's disease." DNA Cell Biol **20**(11): 683-95.
- Makowski, L., Caspar, D. L., et al. (1977). "Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data." J Cell Biol **74**(2): 629-45.
- Maratou, K., Forster, T., et al. (2004). "Expression profiling of the developing testis in wild-type and Dazl knockout mice." Mol Reprod Dev **67**(1): 26-54.
- Martin-du Pan, R. C. and Campana, A. (1993). "Physiopathology of spermatogenic arrest." Fertil Steril **60**(6): 937-46.
- Maruyama, O., Nishimori, H., et al. (1998). "Cloning of TCFL5 encoding a novel human basic helix-loop-helix motif protein that is specifically expressed in primary spermatocytes at the pachytene stage." Cytogenet Cell Genet **82**(1-2): 41-5.
- Meinhardt, A. (2006). Anatomy and Histology of the Male Genital Tract. Andrology for the Clinician. Schill W.B., Comhaire F.H. et al, (Hrsg.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 259-266.
- Mitchell, J. A., Ou, C., et al. (2001). "Parathyroid hormone-induced up-regulation of connexin-43 messenger ribonucleic acid (mRNA) is mediated by sequences within both the promoter and the 3'untranslated region of the mRNA." Endocrinology **142**(2): 907-15.
- Mlecnik, B., Scheideler, M., et al. (2005). "PathwayExplorer: web service for visualizing high-throughput expression data on biological pathways." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W633-7.
- Mograb, B., Corcelle, E., et al. (2003). "Aberrant Connexin 43 endocytosis by the carcinogen lindane involves activation of the ERK/mitogen-activated protein kinase pathway." Carcinogenesis **24**(8): 1415-23.

- Mok, B. W., Yeung, W. S., et al. (1999). "Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes." FEBS Lett **453**(3): 243-8.
- Mori, R., Power, K. T., et al. (2006). "Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration." J Cell Sci **119**(Pt 24): 5193-203.
- Murphy, M. W., Zarkower, D., et al. (2007). "Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA." BMC Mol Biol **8**: 58.
- Musil, L. S. and Goodenough, D. A. (1993). "Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER." Cell **74**(6): 1065-77.
- Musil, L. S., Le, A. C., et al. (2000). "Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function." J Biol Chem **275**(33): 25207-15.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.
- Nayernia, K., Lee, J. H., et al. (2006). "Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells." Lab Invest **86**(7): 654-63.
- Nicholson, B., Dermietzel, R., et al. (1987). "Two homologous protein components of hepatic gap junctions." Nature **329**(6141): 732-4.
- Nieschlag, E. (2000). Classification of Andrological Disorders. Andrology. Nieschlag E., B. H. M. H. Heidelberg, Springer. **2**.
- Nistal, M., Jimenez, F., et al. (1990). "Sertoli cell types in the Sertoli-cell-only syndrome: relationships between Sertoli cell morphology and aetiology." Histopathology **16**(2): 173-80.
- Noll, S. and Schaub-Kuhnen, S. (2000). Praxis der Immunhistochemie. München, Urban und Fischer.
- O'Shaughnessy, P. J., Fleming, L., et al. (2003). "Identification of developmentally regulated genes in the somatic cells of the mouse testis using serial analysis of gene expression." Biol Reprod **69**(3): 797-808.
- Orth, J. M. (1982). "Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study." Anat Rec **203**(4): 485-92.
- Orth, J. M., Gunsalus, G. L., et al. (1988). "Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development." Endocrinology **122**(3): 787-94.
- Oyamada, M., Oyamada, Y., et al. (2005). "Regulation of connexin expression." Biochim Biophys Acta **1719**(1-2): 6-23.

Pangas, S. A., Choi, Y., et al. (2006). "Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8090-5.

Paul, D. L., Ebihara, L., et al. (1991). "Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes." J Cell Biol **115**(4): 1077-89.

Pelletier, R. M. and Byers, S. W. (1992). "The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations." Microsc Res Tech **20**(1): 3-33.

Pelletier, R. M. (1995). "The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes." J Androl **16**(5): 400-9.

Pelliniemi, L. J., Fröjdman, K., et al. (1993). Embryological and Prenatal Development and Functions of Sertoli Cells. The Sertoli Cell. Russel, L. D. and Griswold, M. D. Clearwater, FL, Cache River Press: 87-114.

Perez-Armendariz, E. M., Lamoyi, E., et al. (2001). "Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells." Anat Rec **264**(3): 237-46.

Petrocelli, T. and Lye, S. J. (1993). "Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone." Endocrinology **133**(1): 284-90.

Piechocki, M. P., Burk, R. D., et al. (1999). "Regulation of connexin32 and connexin43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells." Carcinogenesis **20**(3): 401-6.

Piersanti, M. and Lye, S. J. (1995). "Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos." Endocrinology **136**(8): 3571-8.

Pluciennik, F., Joffre, M., et al. (1994). "Follicle-stimulating hormone increases gap junction communication in Sertoli cells from immature rat testis in primary culture." J Membr Biol **139**(2): 81-96.

Pluciennik, F., Verrecchia, F., et al. (1996). "Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes." J Membr Biol **149**(3): 169-77.

Plum, A., Hallas, G., et al. (2000). "Unique and shared functions of different connexins in mice." Curr Biol **10**(18): 1083-91.

Plum, A., Winterhager, E., et al. (2001). "Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation." Dev Biol **231**(2): 334-47.

Pointis, G., Fiorini, C., et al. (2005). "Gap junctional communication in the male reproductive system." Biochim Biophys Acta **1719**(1-2): 102-16.

- Pointis, G., Gilleron, J., et al. (2010). "Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1546): 1607-20.
- Pollmann, M. A., Shao, Q., et al. (2005). "Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture." Breast Cancer Res **7**(4): R522-34.
- Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., et al. (1999). "Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells." J Clin Endocrinol Metab **84**(10): 3836-44.
- Raverot, G., Weiss, J., et al. (2005). "Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis." Dev Biol **283**(1): 215-25.
- Raymond, C. S., Murphy, M. W., et al. (2000). "Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation." Genes Dev **14**(20): 2587-95.
- Reaume, A. G., de Sousa, P. A., et al. (1995). "Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43." Science **267**(5205): 1831-4.
- Reber, M. and Cereghini, S. (2001). "Variant hepatocyte nuclear factor 1 expression in the mouse genital tract." Mech Dev **100**(1): 75-8.
- Revel, J. P. and Karnovsky, M. J. (1967). "Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver." J Cell Biol **33**(3): C7-C12.
- Rey, R. A., Musse, M., et al. (2009). "Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis." Microsc Res Tech **72**(11): 787-95.
- Ripps, H., Qian, H., et al. (2002). "Pharmacological enhancement of hemi-gap-junctional currents in *Xenopus* oocytes." J Neurosci Methods **121**(1): 81-92.
- Risley, M. S., Tan, I. P., et al. (1992). "Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes." J Cell Sci **103** ( Pt 1): 81-96.
- Risley, M. S. (2000). "Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat." Biol Reprod **62**(3): 748-54.
- Risley, M. S., Tan, I. P., et al. (2002). "Gap junctions with varied permeability properties establish cell-type specific communication pathways in the rat seminiferous epithelium." Biol Reprod **67**(3): 945-52.
- Rogers, M., Berestecky, J. M., et al. (1990). "Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein." Mol Carcinog **3**(6): 335-43.

- Roscoe, W. A., Barr, K. J., et al. (2001). "Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43." Biol Reprod **65**(3): 829-38.
- Rose, B. and Loewenstein, W. R. (1976). "Permeability of a cell junction and the local cytoplasmic free ionized calcium concentration: a study with aequorin." J Membr Biol **28**(1): 87-119.
- Rüttinger, C., Bergmann, M., et al. (2008). "Expression of connexin 43 in normal canine testes and canine testicular tumors." Histochem Cell Biol **130**(3): 537-48.
- Ruggiu, M., Speed, R., et al. (1997). "The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis." Nature **389**(6646): 73-7.
- Russel, L. D. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, Cache River Press.
- Saez, J. C., Spray, D. C., et al. (1986). "cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2473-7.
- Saez, J. C., Nairn, A. C., et al. (1990). "Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II." Eur J Biochem **192**(2): 263-73.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., et al. (2003). "Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions." Physiol Rev **83**(4): 1359-400.
- Saitou, M., Furuse, M., et al. (2000). "Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands." Mol Biol Cell **11**(12): 4131-42.
- Saunders, P. T., Turner, J. M., et al. (2003). "Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis." Reproduction **126**(5): 589-97.
- Schiavi, A., Hudder, A., et al. (1999). "Connexin43 mRNA contains a functional internal ribosome entry site." FEBS Lett **464**(3): 118-22.
- Schleiermacher, E. (1980). "Ultrastructural changes of the intercellular relationship in impaired human spermatogenesis." Hum Genet **54**(3): 391-404.
- Schnorr, B. and Kressin, M. (2006). Embryologie der Haustiere. Stuttgart, Enke.
- Schulze and Holstein (1993). Human Sertoli Cell under pathogenical conditions. The Sertoli Cell. Russel L.D., G. M. D. Clearwater: 597-610.
- Segretain, D., Fiorini, C., et al. (2004). "A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway." Biochimie **86**(4-5): 241-4.



Session, D. R., Lee, G. S., et al. (2001). "Characterization of D1Pas1, a mouse autosomal homologue of the human AZFa region DBY, as a nuclear protein in spermatogenic cells." Fertil Steril **76**(4): 804-11.

Sharpe, R. M., McKinnell, C., et al. (2003). "Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood." Reproduction **125**(6): 769-84.

Shima, J. E., McLean, D. J., et al. (2004). "The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis." Biol Reprod **71**(1): 319-30.

Sigg, C. (1979). "Classification of tubular testicular atrophies in the diagnosis of sterility. Significance of the so-called "bunte Atrophie". " Schweiz Med Wochenschr **109**(35): 1284-93.

Smith, J. M., Bowles, J., et al. (2004). "Expression of the tudor-related gene Tdrd5 during development of the male germline in mice." Gene Expr Patterns **4**(6): 701-5.

Söhl, G., Nielsen, P. A., et al. (2003). "Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues." Cell Commun Adhes **10**(1): 27-36.

Söhl, G. and Willecke, K. (2004). "Gap junctions and the connexin protein family." Cardiovasc Res **62**(2): 228-32.

Soper, S. F., van der Heijden, G. W., et al. (2008). "Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis." Dev Cell **15**(2): 285-97.

Sridharan, S., Brehm, R., et al. (2007a). "Role of connexin 43 in Sertoli cells of testis." Ann N Y Acad Sci **1120**: 131-43.

Sridharan, S., Simon, L., et al. (2007b). "Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice." Biol Reprod **76**(5): 804-12.

St-Pierre, N., Dufresne, J., et al. (2003). "Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat." Biol Reprod **68**(4): 1232-40.

Steger, K., Rey, R., et al. (1999a). "Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis." Hum Reprod **14**(1): 136-43.

Steger, K., Tetens, F., et al. (1999b). "Expression of connexin 43 in human testis." Histochem Cell Biol **112**(3): 215-20.

Stock, A. and Sies, H. (2000). "Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter." Biol Chem **381**(9-10): 973-9.

- Suarez-Quian, C. A., Martinez-Garcia, F., et al. (1999). "Androgen receptor distribution in adult human testis." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 350-8.
- Tan, I. P., Roy, C., et al. (1996). "Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions." Biol Reprod **54**(6): 1300-10.
- Tan, L. W., Bianco, T., et al. (2002). "Variable promoter region CpG island methylation of the putative tumor suppressor gene Connexin 26 in breast cancer." Carcinogenesis **23**(2): 231-6.
- Tanmahasamut, P. and Sidell, N. (2005). "Up-regulation of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression by retinoic acid in human endometrial stromal cells." J Clin Endocrinol Metab **90**(7): 4151-6.
- Teunissen, B. E., van Amersfoort, S. C., et al. (2002). "Sp1 and Sp3 activate the rat connexin40 proximal promoter." Biochem Biophys Res Commun **292**(1): 71-8.
- Teunissen, B. E., Jansen, A. T., et al. (2003). "Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes." Gene **322**: 123-36.
- Theis, M., Magin, T. M., et al. (2000). "General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse." Methods **20**(2): 205-18.
- Traub, O., Look, J., et al. (1989). "Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes." J Cell Biol **108**(3): 1039-51.
- Valiunas, V., Beyer, E. C., et al. (2002). "Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity." Circ Res **91**(2): 104-11.
- van der Heyden, M. A., Rook, M. B., et al. (1998). "Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling." J Cell Sci **111** ( Pt 12): 1741-9.
- Vergouwen, R. P., Jacobs, S. G., et al. (1991). "Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice." J Reprod Fertil **93**(1): 233-43.
- Vine, A. L. and Bertram, J. S. (2005). "Upregulation of connexin 43 by retinoids but not by non-provitamin A carotenoids requires RARs." Nutr Cancer **52**(1): 105-13.
- Vine, A. L., Leung, Y. M., et al. (2005). "Transcriptional regulation of connexin 43 expression by retinoids and carotenoids: similarities and differences." Mol Carcinog **43**(2): 75-85.
- Wang, P. J., McCarrey, J. R., et al. (2001). "An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia." Nat Genet **27**(4): 422-6.
- Wei, C. J., Xu, X., et al. (2004). "Connexins and cell signaling in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 811-38.

Weider, K., Bergmann, M., et al. (2011). "Altered differentiation and clustering of Sertoli cells in transgenic mice showing a Sertoli cell specific knockout of the connexin 43 gene." Differentiation.

Weinbauer, G. F., Gromoll, J., et al. (2000). Physiology of Testicular Function. Male Reproductive Health and Dysfunction. Nieschlag, E. and Behre, H. M., (Hrsg). Heidelberg, Springer Verlag: 23-57.

White, T. W., Bruzzone, R., et al. (1995). "The connexin family of intercellular channel forming proteins." Kidney Int **48**(4): 1148-57.

Willecke, K., Eiberger, J., et al. (2002). "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome." Biol Chem **383**(5): 725-37.

Williams, K., McKinnell, C., et al. (2001). "Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man." Hum Reprod Update **7**(3): 236-47.

Winterhager, E., Pielensticker, N., et al. (2007). "Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart." BMC Dev Biol **7**: 26.

Wrobel, K. and Bergmann, M. (2006). Male Reproductive System. Dellmann's textbook of veterinary histology. Jo Ann Eurell, D.; Brian L. Frappier: 233-255.

Xu, X., Li, W. E., et al. (2001). "Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions." J Cell Biol **154**(1): 217-30.

Yan, W., Rajkovic, A., et al. (2002). "Identification of Gasz, an evolutionarily conserved gene expressed exclusively in germ cells and encoding a protein with four ankyrin repeats, a sterile-alpha motif, and a basic leucine zipper." Mol Endocrinol **16**(6): 1168-84.

Yang, F., De La Fuente, R., et al. (2006). "Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis." J Cell Biol **173**(4): 497-507.

Yang, F., Gell, K., et al. (2008). "Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor." Genes Dev **22**(5): 682-91.

Yao, P. L., Lin, Y. C., et al. (2010). "Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2." Biol Reprod **82**(3): 516-27.

Yu, Z., Guo, R., et al. (2003). "Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis." Biol Reprod **69**(1): 37-47.

Zhang, Y. W., Nakayama, K., et al. (2003). "A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2)." Cancer Res **63**(7): 1623-30.

Zhou, Q., Nie, R., et al. (2008). "Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: an in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes." Biol Reprod **79**(1): 35-42.

## 8 Bezugsquellen

### 8.1 Stoffe und Reagenzien

ABC-Elite Kit Standard, Vector Vectastain	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Bioline, Luckenwalde
Alkohol (Ethanol, 100%iger)	Roth, Karlsruhe
Alkohol (Ethanol, vergällt 100%)	Schmitt, Dillenburg
APES	Merck, Darmstadt
Aqua Polymouth	Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA
$\beta$ -Merkaptoethanol	SERVA, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
$C_2H_8O_7 \times H_2O$ (Zitronensäure)	Merck, Darmstadt
$C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$ (Natriumcitrat)	Merck, Darmstadt
DNA Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP Mix, 19mM	Promega, Mannheim
Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	SERVA, Heidelberg
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck, Darmstadt

Formalin 37%	Merck, Darmstadt
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward, CA, USA
GeneAmp® 10 mM dNTP Mix with dTTP	Promega, Mannheim
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
GoTaq® Flexi Buffer (5xGreen)	Promega, Mannheim
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Roth, Karlsruhe
Ketamin Hydrochlorid	Medistar, Holzwickede
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
iQ SYBR Green Supermix	BioRad, München
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NeutrAvidin Dylight 488	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Marker (1 kb DNA Ladder)	New England Biolabs, Frankfurt
Marker (PCR 100 bp Low Ladder)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

MessageAmp II Kit	Ambion, Applied Biosystems Inc., Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> Solution (25mM)	Promega, Mannheim
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	Applied Biosystems, Darmstadt
Paraffin	Vogel, Giessen
Peroxidase Substrat Kit AEC	Biologo, Kronshagen
Peroxidase Substrat Kit DAB	Biologo, Kronshagen
Pikrinsäure	Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Primärantikörper, β-Galaktosidase (ab616)	Abcam, Cambridge
Primärantikörper, Connexin 43 (#3512)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Primärantikörper, Dazl (MCA2336)	AbD Serotec, Düsseldorf
Primärantikörper, Occludin (#71-1500)	Zymed Laboratories Inc., South San Francisco
Primärantikörper, MIS (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Primärantikörper, Stra8	Griswold, School of Molekular Biosciences, Washington State University, Pullman, USA
Primärantikörper, Dmrt7	Zarkower, Department of Genetics, Cell Biology and Development,

	University of Minnesota, Minneapolis, USA
Primer	Eurofins, Ebersberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Random Hexamers (50 µM)	Applied Biosystems/ Ambion, Darmstadt
RNAlater <sup>®</sup> -ICE	Applied Biosystems/ Ambion, Darmstadt
RNase-AWAY <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	Applied Biosystems/ Ambion, Darmstadt
RNeasy Micro <sup>®</sup> Kit	Qiagen, Hilden
Salzsäure, konzentriert	Merck, Darmstadt
Shandon Instant Eosin	Thermo Electron Coperation, Anatomocal Pathology, Pittsburg, USA
Shandon Instant Hematoxylin	Thermo Scientific USA, Anatomocal Pathology, Pittsburg, USA
Sekundärantikörper, biot. Kaninchen-Anti-Ziege	(E0466); Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Sekundärantikörper, biot. Ziege-Anti-Maus	(E0433); Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark



Sekundärantikörper, biot. Ziege-Anti-Kaninchen	(E0432); Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
SYBR <sup>®</sup> GREEN I	Sigma, Saint Louis, USA
TrisBase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris-HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton-X 100	Merck, Darmstadt
Viagen Direct PCR-Tail	Viagen Biotech, Inc., Los Angeles USA
Vitro-Clud	Roth, Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylol	Roth, Karlsruhe
8.2 Sonstiges Material	
Biopsie-Einbettkörbchen	Roth, Karlsruhe
CodeLink Mouse Whole Genome Bioarray	Applied Microarrays, Inc., Tempe, AZ, USA
Microseal <sup>®</sup> 'B' Adhesive Seals	Biorad, München
Mikroreaktionsgefäße, Multi <sup>®</sup>	Roth, Karlsruhe
Objektträger; Super-Frost	Langenbrinck, Emmerdingen

PARAFILM®	Pechiney Plastic Packing, Chicago, USA
Pinzetten	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen, gestopft	nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe
Skalpellklinge	Produkte für die Medizin AG, Köln
UVette®	Eppendorf AG, Hamburg
8.3            Geräte	
Agarosegel Mini Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Agilent 2100 bioanalyzer	Agilent Technologys, Böblingen
Analysewaage (ANALytical Plus)	OHAUS GmbH, Giessen
Autoklav	MAGV, Rabenau-Londorf
Axio Observer	Zeiss, Oberkochen
Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Ausgießstation Leica EG1160	Leica, Bensheim
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CFX96™ Real-Time System	BioRad, München
Entwässerungsgerät LEICA/JUNG TP 1050	Leica, Bensheim
GenePix 4000 B scanner	Arlington Instruments, Arlington, USA
Heizplatte	MAGV, Rabenau-Londorf

Inkubationskammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Magnetrührer	MAGV, Rabenau-Londorf
Mikrowelle, Privileg 8020	Quelle, Fürth
Minitron shaker incubator	Infors AG, Bottmingen
NanoDrop	NanoDrop Technologies, Rockland DE, USA
pH-Meter, inoLAB pH level1	inoLAB <sup>®</sup> , Weilheim
Leica Mikroskops CM E	Leica, Wetzlar
Low-Profile Multiplate Unskirted PCR Plates	BioRad, München
Ocular E <sub>2</sub> Plan 40x/0.65	Leica, Wetzlar
Ocular Plan-Apochromat 20x	Zeiss, Oberkochen
Ocular PLAN-Neofluar 40x	Zeiss, Oberkochen
Paraffinstreckbad, Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
BioRad PowerPac 200	BioRad, München
Schlittenmikrotom Modell SM 2000 R	Leica Microsystems, Bensheim
Schüttler IKA <sup>®</sup> KS 130basic	IKA <sup>®</sup> Werke, Staufen
Sterilisator, Heraeus	MAGV, Rabenau-Londorf
T3 Thermocycler	Biometra <sup>®</sup> , Göttingen
Thermal printer Mitsubishi P93E	Biometra <sup>®</sup> , Göttingen

Vortexer	Heidolph, Schwalbach
Wärmeschränk	Memmert GmbH und CoKG, Schwabach
Transilluminator UVsolo L	Biometra, Göttingen
Ultra-TURRAX®	IKA®Werke, Staufen
Wasserbad, Typ WB7	Memmert, Schwabach
Zentrifuge, Micro 120	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
8.4            Software	
AxioVision Rel.4.7.2 Software	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
analySIS® Software	Soft Imaging System GmbH, Münster
Beacon Designer Software	BioRad, München
BMDP Statistical Software Package	Statistical Solutions Ltd., Cork, Ireland
CFX™ Manager Software	Biorad, München
CodeLink System Software	GE Healthcare, München
GenePix Pro 4.0 Software	Axon Instruments, Arlington, USA
Ingenuity® Systems	Ingenuity Systems, Inc.  Redwood City, CA, USA
Microsoft Office Excel 2007	Amazon, Bad Hersfeld

## 9 Liste der signifikant veränderten Gene

ACCN	Gene Symbol	Genname	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_008791.2	Pcp4	Purkinje cell protein 4	0,00	1,00	0,00	59,79
NM_028121.2	Adpgk	ADP-dependent glucokinase	0,00	1,00	0,00	21,50
NM_009606.1	Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	0,01	1,00	0,00	11,99
AK032000.1			0,01	1,00	0,00	11,79
BI106231.1	Kpna2	karyopherin (importin) alpha 2	0,00	1,00	0,00	7,36
BC038320.1			0,00	1,00	0,00	7,31
AK077867.1	2900097C17Rik	RIKEN cDNA 2900097C17 gene	0,00	1,00	0,00	6,80
AI506359.1	Arhgef12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	0,01	1,00	0,00	6,02
NM_020265.3	Dkk2	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	0,00	1,00	0,00	6,01
AK078610.1	Fam155a	family with sequence similarity 155, member A	0,01	1,00	0,00	5,32
NM_008263.1	Hoxa10	homeobox A10	0,01	1,00	0,00	5,21
NM_009262.2	Spock1	sparc/osteonectin, cwcw and kazal-like domains proteoglycan 1	0,01	1,00	0,00	4,95
NM_010450.1	Hoxa11	homeo box A11	0,00	1,00	0,00	4,81
NM_013602.2	Mt1	metallothionein 1	0,01	1,00	0,00	4,74
AW494725.1			0,05	1,00	0,00	4,47
NM_023127.1	Polr2k	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K	0,00	1,00	0,00	4,37
AK087736.1	E330013P06	hypothetical protein E330013P06	0,01	1,00	0,00	4,22
NM_177794.2	Tmem26	transmembrane protein 26	0,02	1,00	0,00	4,15
NM_001001332.1	Stfa1	stefin A1	0,00	1,00	0,00	4,13
NM_133362.1	Erdr1	erythroid differentiation regulator 1	0,00	1,00	0,00	4,06
AK034241.1	A930018M24Rik	RIKEN cDNA A930018M24 gene	0,02	1,00	0,00	3,94
BU700460.1			0,01	1,00	0,00	3,78
NM_139219.1	Defb9	defensin beta 9	0,02	1,00	0,00	3,66
AK030913.1	Mid1	midline 1	0,04	1,00	0,00	3,66
NM_009626.2	Adh7	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	0,01	1,00	0,00	3,62
NM_134218.1	Vmn1r208	vomeroneasal 1 receptor 208	0,03	1,00	0,00	3,55
CK330720.1	Mid1	midline 1	0,03	1,00	0,00	3,52
AK013590.1	2900024J01Rik	RIKEN cDNA 2900024J01 gene	0,04	1,00	0,00	3,41
AK079512.1	Rgs10	regulator of G-protein signalling 10	0,01	1,00	0,00	3,36
AK078237.1			0,01	1,00	0,00	3,32

ACCN	Gene Symbol	Genname	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
BM938798.1	Cadps	Ca2+-dependent secretion activator	0,01	1,00	0,00	3,21
NM_133924.1	Snx21	sorting nexin family member 21	0,04	1,00	0,00	3,17
NM_011338.1	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	0,02	1,00	0,00	3,13
AK053112.1	Tns1	tensin 1	0,02	1,00	0,00	3,11
NM_011332.2	Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	0,00	1,00	0,00	3,02
NM_009114.1	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	0,00	1,00	0,00	3,02
NM_010157.3	Esr2	estrogen receptor 2 (beta)	0,04	1,00	0,00	3,01
AI929868.1	Plcb1	phospholipase C, beta 1	0,03	1,00	0,00	3,00
NM_009144.1	Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2	0,02	1,00	0,00	2,98
NM_008273.1	Hoxd11	homeobox D11	0,01	1,00	0,00	2,96
BG095502.1			0,01	1,00	0,00	2,91
AK122245.2	Rimbp2	RIMS binding protein 2	0,01	1,00	0,00	2,88
NM_017465.1	Sult2b1	sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1	0,02	1,00	0,00	2,88
NM_009573.3	Zic1	zinc finger protein of the cerebellum 1	0,02	1,00	0,00	2,87
AK079637.1	Ppp1r3g	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3G	0,01	1,00	0,00	2,86
BC082537.1	Hepacam	hepatocyte cell adhesion molecule	0,03	1,00	0,00	2,84
BF581959.1	Zfp949	zinc finger protein 949	0,01	1,00	0,00	2,83
NM_175418.3	Mybpc1	myosin binding protein C, slow-type	0,02	1,00	0,00	2,83
AK083974.1			0,01	1,00	0,00	2,77
BE949104.1	Tacc2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	0,04	1,00	0,00	2,76
BM229163.2			0,01	1,00	0,00	2,74
NM_007473.3	Aqp7	aquaporin 7	0,02	1,00	0,00	2,73
NM_009139.1	Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6	0,04	1,00	0,00	2,72
NM_020505.1	Vav3	vav 3 oncogene	0,02	1,00	0,00	2,69
NM_009394.2	Tnnc2	troponin C2, fast	0,00	1,00	0,00	2,67
BB245041.2	Kctd8	potassium channel tetramerisation domain containing 8	0,05	1,00	0,00	2,67
NM_008926.2	Prkg2	protein kinase, cGMP-dependent, type II	0,00	1,00	0,00	2,65
AA726096.1	Rpl10a-ps2	ribosomal protein L10A, pseudogene 2	0,01	1,00	0,00	2,65
NM_025288.1	Stfa3	stefin A3	0,01	1,00	0,00	2,64

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_173446.1	Fam155a	family with sequence similarity 155, member A	0,02	1,00	0,00	2,64
NM_175418.3	Mybpc1	myosin binding protein C, slow-type	0,00	1,00	0,00	2,62
AK012039.1			0,02	1,00	0,00	2,58
NM_007817.1	Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	0,01	1,00	0,00	2,58
NM_009685.1	Apbb1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1	0,01	1,00	0,00	2,55
NM_031396.1	Cnnm1	cyclin M1	0,01	1,00	0,00	2,53
NM_172621.1	Clic5	chloride intracellular channel 5	0,00	1,00	0,00	2,53
CB847142.2			0,01	1,00	0,00	2,53
AK044114.1	B230208B08Rik	RIKEN cDNA B230208B08 gene	0,03	1,00	0,00	2,50
NM_177275.2	Amigo3	amphoterin induced gene and ORF 3	0,01	1,00	0,00	2,49
BM234787.2			0,02	1,00	0,00	2,49
AK017987.1			0,01	1,00	0,00	2,48
AK084170.1			0,00	1,00	0,00	2,48
NM_009731.1	Akr1b7	aldo-keto reductase family 1, member B7	0,03	1,00	0,00	2,48
BM244450.2	Ralgapa1	Ral GTPase activating protein, alpha subunit 1	0,02	1,00	0,00	2,45
BM205157.2			0,01	1,00	0,00	2,44
BQ174503.1			0,01	1,00	0,00	2,41
NM_181596.2	Retnlg	resistin like gamma	0,03	1,00	0,00	2,39
BB450465.2			0,01	1,00	0,00	2,39
AK035507.1	Pgm5	phosphoglucomutase 5	0,00	1,00	0,00	2,37
NM_021477.3	Rbfox1	RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 1	0,04	1,00	0,00	2,36
NM_133982.1	Rpp25	ribonuclease P 25 subunit (human)	0,01	1,00	0,00	2,34
BB804671.1			0,01	1,00	0,00	2,33
BI694853.1	Mid1	midline 1	0,00	1,00	0,00	2,33
BX528891.1	Cnnm1	cyclin M1	0,00	1,00	0,00	2,30
BG070526.2			0,01	1,00	0,00	2,30
NM_153801.1	Tecrl	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like	0,04	1,00	0,00	2,29
BE952863.1			0,02	1,00	0,00	2,25
NM_010352.1	Gsg1	germ cell-specific gene 1	0,03	1,00	0,00	2,25
AK004706.1	Mdga1	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1	0,00	1,00	0,00	2,25

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
CF578283.1	Gpc6	glypican 6	0,01	1,00	0,00	2,25
AK048587.1	Zfp182	zinc finger protein 182	0,02	1,00	0,00	2,24
NM_009610.1	Actg2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0,01	1,00	0,00	2,24
NM_009922.2	Cnn1	calponin 1	0,03	1,00	0,00	2,24
AK077881.1			0,04	1,00	0,00	2,20
AK038705.1			0,01	1,00	0,00	2,19
AV297662.1			0,05	1,00	0,00	2,18
NM_175189.3	Hepacam	hepatocyte cell adhesion molecule	0,01	1,00	0,00	2,17
BX512545.1			0,04	1,00	0,00	2,16
NM_007686.1	Cfi	complement component factor i	0,00	1,00	0,00	2,16
AI585482.1			0,03	1,00	0,00	2,16
AK018644.1			0,04	1,00	0,00	2,15
NM_146969.1	Olf1243	olfactory receptor 1243	0,01	1,00	0,00	2,14
NM_020258.2	Slc37a2	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	0,02	1,00	0,00	2,13
AK034278.1	Mrap2	melanocortin 2 receptor accessory protein 2	0,05	1,00	0,00	2,13
NM_010701.1	Lect1	leukocyte cell derived chemotaxin 1	0,05	1,00	0,00	2,13
BB315069.2			0,03	1,00	0,00	2,13
BB343266.2	Dip2b	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (Drosophila)	0,02	1,00	0,00	2,12
NM_176933.3	Dusp4	dual specificity phosphatase 4	0,03	1,00	0,00	2,12
AK086355.1	Lsmp	limbic system-associated membrane protein	0,03	1,00	0,00	2,12
BC082538.1	P4ha3	procollagen-proline, 2- oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide III	0,04	1,00	0,00	2,10
AI574175.1	AI574175	expressed sequence AI574175	0,03	1,00	0,00	2,09
AK087305.1			0,02	1,00	0,00	2,09
NM_008518.1	Ltb	lymphotoxin B	0,00	1,00	0,00	2,08
BQ175159.1	Ppm1h	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)	0,02	1,00	0,00	2,07
AK020222.1	Dnhd1	dynein heavy chain domain 1	0,03	1,00	0,00	2,07
CK334862.1	Hist1h2ae	histone cluster 1, H2ae	0,02	1,00	0,00	2,07
BE943834.1	Meis2	Meis homeobox 2	0,05	1,00	0,00	2,07
BE980253.1	Rab27b	RAB27b, member RAS oncogene family	0,02	1,00	0,00	2,07



ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_009978.1	Cst8	cystatin 8 (cystatin-related epididymal spermatogenic)	0,00	1,00	0,00	2,06
CA874096.1	Trps1	trichorhinophalangeal syndrome I (human)	0,04	1,00	0,00	2,06
NM_026324.1	Kirrel3	kin of IRRE like 3 (Drosophila)	0,04	1,00	0,00	2,06
NM_010825.2	Meis2	Meis homeobox 2	0,00	1,00	0,00	2,06
NM_029898.1	Ankrd55	ankyrin repeat domain 55	0,03	1,00	0,00	2,06
AK038787.1	Robo1	roundabout homolog 1 (Drosophila)	0,02	1,00	0,00	2,05
BB268463.2			0,01	1,00	0,00	2,04
NM_146334.1	Olfr1330	olfactory receptor 1330	0,00	1,00	0,00	2,04
NM_183126.1	6030498E09Rik	RIKEN cDNA 6030498E09 gene	0,04	1,00	0,00	2,04
BC062894.1			0,02	1,00	0,00	2,03
AU067815.1	Xkr4	X Kell blood group precursor related family member 4	0,03	1,00	0,00	2,03
AK012380.1	Shisa9	shisa homolog 9 (Xenopus laevis)	0,04	1,00	0,00	2,03
AA920804.1	Themis	thymocyte selection associated	0,03	1,00	0,00	2,02
BF453892.1	Serinc3	serine incorporator 3	0,02	1,00	0,00	2,02
NM_027024.2	Cst13	cystatin 13	0,01	1,00	0,00	2,02
NM_175418.3	Mybpc1	myosin binding protein C, slow-type	0,02	1,00	0,00	2,02
BY762577.1	Ikzf3	IKAROS family zinc finger 3	0,00	1,00	0,00	2,01
NM_144524.1	Angel1	angel homolog 1 (Drosophila)	0,02	0,00	1,00	-2,00
NM_145946.1	Fanci	Fanconi anemia, complementation group I	0,02	0,00	1,00	-2,01
BC020182.1			0,00	0,00	1,00	-2,01
NM_009445.1	Ttk	Ttk protein kinase	0,00	0,00	1,00	-2,01
AI451538.1	E330020D12Rik	Riken cDNA E330020D12 gene	0,04	0,00	1,00	-2,01
NM_010601.2	Kcnh3	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3	0,03	0,00	1,00	-2,02
NM_001008973.1	Tmem232	transmembrane protein 232	0,00	0,00	1,00	-2,02
NM_033571.1	Fkbp6	FK506 binding protein 6	0,00	0,00	1,00	-2,02
AK082809.1	Fbxo15	F-box protein 15	0,04	0,00	1,00	-2,02
NM_152818.2	Osbp2	oxysterol binding protein 2	0,00	0,00	1,00	-2,02
NM_153544.2	BC030867	cDNA sequence BC030867	0,01	0,00	1,00	-2,02
CA450918.1	Efcab10	EF-hand calcium binding domain 10	0,03	0,00	1,00	-2,03
NM_009882.2	Cebpz	CCAAT/enhancer binding protein zeta	0,02	0,00	1,00	-2,03

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
BC048955.1	Utp20	UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	0,02	0,00	1,00	-2,03
NM_207201.1	Olfr8	olfactory receptor 8	0,03	0,00	1,00	-2,03
NM_019927.1	Arih1	ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein homolog 1 (Drosophila)	0,03	0,00	1,00	-2,04
NM_019460.1	Sfmbt1	Scm-like with four mbt domains 1	0,02	0,00	1,00	-2,04
NM_134063.2			0,00	0,00	1,00	-2,04
NM_144804.1	Depdc7	DEP domain containing 7	0,03	0,00	1,00	-2,04
CA570565.1	Osbp19	oxysterol binding protein-like 9	0,02	0,00	1,00	-2,04
AK006382.1	Akap13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	0,02	0,00	1,00	-2,05
NM_153457.6	Rtn1	reticulon 1 (Rtn1), transcript variant 1	0,00	0,00	1,00	-2,05
NM_011575.1	Tff3	trefoil factor 3, intestinal	0,04	0,00	1,00	-2,05
NM_029094.1	Pik3cb	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	0,00	0,00	1,00	-2,05
NM_031377.1	Pramel1	preferentially expressed antigen in melanoma-like 1	0,05	0,00	1,00	-2,06
NM_080848.1	Wdr5	WD repeat domain 5	0,00	0,00	1,00	-2,06
NM_027963.1	Wdr16	WD repeat domain 16	0,00	0,00	1,00	-2,07
NM_172285.1	Plcg2	phospholipase C, gamma 2	0,01	0,00	1,00	-2,07
NM_008821.1	Pet2	plasmacytoma expressed transcript 2	0,01	0,00	1,00	-2,07
AK082498.1	C230057A21Rik	RIKEN cDNA C230057A21 gene	0,01	0,00	1,00	-2,07
BC036332.1			0,03	0,00	1,00	-2,08
NM_029761.2	Dok5	docking protein 5	0,02	0,00	1,00	-2,08
NM_019819.2	Dusp14	dual specificity phosphatase 14	0,00	0,00	1,00	-2,08
NM_027000.2	Gtpbp4	GTP binding protein 4	0,01	0,00	1,00	-2,08
NM_026858.2	Xrcc6bp1	XRCC6 binding protein 1	0,00	0,00	1,00	-2,08
BB268360.2	Uba3	ubiquitin-like modifier activating enzyme 3	0,04	0,00	1,00	-2,08
NM_053268.1	Rasa2	RAS p21 protein activator 2	0,05	0,00	1,00	-2,08
NM_026924.2	Ovol2	ovo-like 2 (Drosophila)	0,02	0,00	1,00	-2,09
BC023785.1	Rreb1	ras responsive element binding protein 1	0,00	0,00	1,00	-2,09
AK015922.1			0,05	0,00	1,00	-2,10
NM_016899.2	Rab25	RAB25, member RAS oncogene family	0,01	0,00	1,00	-2,10
NM_008299.1	Dnajb3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 3	0,03	0,00	1,00	-2,10

ACCN	Gene Symbol	Gencode	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_016865.2	Htatip2	HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human)	0,04	0,00	1,00	-2,10
X90648.1	Crkl	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	0,02	0,00	1,00	-2,10
NM_007939.1	Epha8	Eph receptor A8	0,02	0,00	1,00	-2,11
NM_009677.3	Ap1g1	adaptor protein complex AP-1, gamma 1 subunit	0,04	0,00	1,00	-2,11
NM_001029895.1	Ate1	arginyltransferase 1	0,01	0,00	1,00	-2,11
BB554612.2			0,02	0,00	1,00	-2,11
NM_027221.1	Krtcap3	keratinocyte associated protein 3	0,01	0,00	1,00	-2,11
U43892.1	Abcb7	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7	0,02	0,00	1,00	-2,12
AK015678.1	4930502E18Rik	RIKEN cDNA 4930502E18 gene	0,00	0,00	1,00	-2,12
NM_178263.1	Ankrd27	ankyrin repeat domain 27 (VPS9 domain)	0,03	0,00	1,00	-2,13
BM240956.2	Zfp850	zinc finger protein 850	0,04	0,00	1,00	-2,13
BB652115.1	Gm1679	predicted gene 1679	0,00	0,00	1,00	-2,13
BU756529.1	Zcchc2	zinc finger, CCHC domain containing 2	0,01	0,00	1,00	-2,13
AV117999.1	Trim71	tripartite motif-containing 71	0,05	0,00	1,00	-2,13
AK045740.1			0,01	0,00	1,00	-2,13
BM120306.2	Nr3c2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	0,01	0,00	1,00	-2,13
NM_001003960.1	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B (Dnmt3b), transcript variant 2	0,00	0,00	1,00	-2,13
BC013712.1	BC013712	cDNA sequence BC013712	0,01	0,00	1,00	-2,14
NM_009647.2	Ak4	adenylate kinase 4	0,00	0,00	1,00	-2,14
NM_009359.1	Tex9	testis expressed gene 9	0,01	0,00	1,00	-2,14
BY761173.1	Slc39a9	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 9	0,00	0,00	1,00	-2,14
BY703358.1			0,01	0,00	1,00	-2,14
AK007274.1	Fbxw27	F-box and WD-40 domain protein 27	0,00	0,00	1,00	-2,14
NM_010616.1	Kif12	kinesin family member 12	0,01	0,00	1,00	-2,14
NM_177616.2	Ccdc157	coiled-coil domain containing 157	0,02	0,00	1,00	-2,15
BC006583.1	Ccdc136	coiled-coil domain containing 136	0,03	0,00	1,00	-2,15
NM_011261.1	Reln	reelin	0,02	0,00	1,00	-2,15
NM_053072.2	Fgd6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	0,01	0,00	1,00	-2,16
NM_029627.1	Ly6k	lymphocyte antigen 6 complex, locus K	0,00	0,00	1,00	-2,17

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_028622.1	Lce1c	late cornified envelope 1C	0,05	0,00	1,00	-2,17
D12645.1	Kif3a	kinesin family member 3A	0,01	0,00	1,00	-2,17
AK007856.1	Ttc39b	tetratricopeptide repeat domain 39B	0,00	0,00	1,00	-2,17
NM_152825.1	Usp45	ubiquitin specific petidase 45	0,03	0,00	1,00	-2,17
NM_172923.1	AI118078	expressed sequence AI118078	0,00	0,00	1,00	-2,18
NM_026283.1	Samd8	sterile alpha motif domain containing 8	0,03	0,00	1,00	-2,18
CO806983.1			0,02	0,00	1,00	-2,19
NM_008468.1	Kpna6	karyopherin (importin) alpha 6	0,00	0,00	1,00	-2,19
BY742236.1			0,01	0,00	1,00	-2,19
BQ555385.1	Chrna7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7	0,02	0,00	1,00	-2,19
NM_016660.1	Hmga1	high mobility group AT-hook 1	0,00	0,00	1,00	-2,21
NM_011560.2	Tcte3	t-complex-associated testis expressed 3	0,00	0,00	1,00	-2,21
AK129287.1	Whsc1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (human)	0,01	0,00	1,00	-2,21
AI323998.1			0,00	0,00	1,00	-2,22
NM_008690.2	Nfkbie	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	0,02	0,00	1,00	-2,22
NM_010633.3	Uhmk1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	0,00	0,00	1,00	-2,22
NM_201364.1			0,05	0,00	1,00	-2,22
NM_001007580.1	Fndc3c1	fibronectin type III domain containing 3C1	0,00	0,00	1,00	-2,22
BB559411.2			0,04	0,00	1,00	-2,23
CA464433.1			0,04	0,00	1,00	-2,25
NM_176972.2	Usp37	ubiquitin specific peptidase 37	0,00	0,00	1,00	-2,25
BC042745.1	A330069E16Rik	RIKEN cDNA A330069E16 gene	0,02	0,00	1,00	-2,25
AV347067.2	6430590A07Rik	RIKEN cDNA 6430590A07 gene	0,00	0,00	1,00	-2,25
J04847.1	D1Pas1	DNA segment, Chr 1, Pasteur Institute 1	0,01	0,00	1,00	-2,26
NM_015785.1	Zpbp	zona pellucida binding protein	0,04	0,00	1,00	-2,26
NM_025276.2	Evpl	envoplakin	0,00	0,00	1,00	-2,26
NM_011234.2	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	0,04	0,00	1,00	-2,26
BB268253.1			0,03	0,00	1,00	-2,26
BU756239.1	Nup62cl	nucleoporin 62 C-terminal like	0,00	0,00	1,00	-2,27
NM_144527.2	Ccdc21	coiled-coil domain containing 21	0,04	0,00	1,00	-2,27
AK007177.1	1700112H15Rik	RIKEN cDNA 1700112H15 gene	0,00	0,00	1,00	-2,28

ACCN	Gene Symbol	Gencode	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
BF450484.1	Pign	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class N	0,04	0,00	1,00	-2,29
BU937304.1	Gm12260	histone cluster 1, H3 pseudogene	0,02	0,00	1,00	-2,30
NM_008279.1	Map4k1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	0,00	0,00	1,00	-2,31
AK082203.1			0,01	0,00	1,00	-2,31
NM_058214.1	Recql4	RecQ protein-like 4	0,03	0,00	1,00	-2,31
NM_026097.1	Rffl	ring finger and FYVE like domain containing protein	0,00	0,00	1,00	-2,31
NM_008554.2	Ascl2	achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila)	0,00	0,00	1,00	-2,32
AK015275.1	Otud4	OTU domain containing 4	0,00	0,00	1,00	-2,32
AK081550.1	Armc6	armadillo repeat containing 6	0,01	0,00	1,00	-2,32
X62537.1	Cbx2	chromobox homolog 2 (Drosophila Pc class)	0,00	0,00	1,00	-2,33
BY368931.1			0,00	0,00	1,00	-2,33
NM_012020.1	Foxl2	forkhead box L2	0,03	0,00	1,00	-2,33
NM_025979.2	Mastl	microtubule associated serine/threonine kinase-like	0,00	0,00	1,00	-2,34
BY710919.1			0,01	0,00	1,00	-2,34
AK084586.1	Mphosph9	M-phase phosphoprotein 9	0,02	0,00	1,00	-2,34
AK079871.1			0,03	0,00	1,00	-2,35
NM_175430.2	Ccdc40	coiled-coil domain containing 40	0,03	0,00	1,00	-2,35
NM_177857.1	Dennd2c	DENN/MADD domain containing 2C	0,00	0,00	1,00	-2,35
AK076551.1	Rad51c	RAD51 homolog c (S. cerevisiae)	0,03	0,00	1,00	-2,35
BC096609.1	Ankrd34b	ankyrin repeat domain 34B	0,05	0,00	1,00	-2,35
NM_031870.1	Msh4	mutS homolog 4 (E. coli)	0,01	0,00	1,00	-2,38
NM_020002.2	Rec8	REC8 homolog (yeast)	0,01	0,00	1,00	-2,38
NM_011670.1	Uchl1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	0,00	0,00	1,00	-2,38
BC042449.1	Rasgrf1	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	0,01	0,00	1,00	-2,38
CN843262.1	1700024P04Rik	RIKEN cDNA 1700024P04 gene	0,02	0,00	1,00	-2,38
NM_011040.2	Pax8	paired box gene 8	0,02	0,00	1,00	-2,38
AY497009.1	Rictor	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2	0,00	0,00	1,00	-2,39
NM_011848.1	Nek3	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 3	0,00	0,00	1,00	-2,39
NM_010426.1	Foxf1a	forkhead box F1a	0,00	0,00	1,00	-2,39

ACCN	Gene Symbol	Gencode	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
BF534000.1	Pdxk	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	0,00	0,00	1,00	-2,40
AK010717.1	Psma8	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 8	0,03	0,00	1,00	-2,41
NM_145833.1	Lin28a	lin-28 homolog A (C. elegans)	0,01	0,00	1,00	-2,42
NM_019935.2	Ovol1	OVO homolog-like 1 (Drosophila)	0,04	0,00	1,00	-2,42
BB698563.1	Pnma5	paraneoplastic antigen family 5	0,01	0,00	1,00	-2,42
AK005563.1	Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	0,00	0,00	1,00	-2,42
NM_021315.1	Noc3l	nucleolar complex associated 3 homolog (S. cerevisiae)	0,00	0,00	1,00	-2,42
NM_023270.3	Rnf128	ring finger protein 128	0,03	0,00	1,00	-2,43
AK021218.1	C330022B21Rik	RIKEN cDNA C330022B21 gene	0,01	0,00	1,00	-2,43
BG298178.1	Pnldc1	poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1	0,04	0,00	1,00	-2,44
NM_134109.1	Illdr1	immunoglobulin-like domain containing receptor 1	0,01	0,00	1,00	-2,44
BC018510.1	Atf7ip2	activating transcription factor 7 interacting protein 2	0,04	0,00	1,00	-2,45
NM_146227.2	Prss50	protease, serine, 50	0,04	0,00	1,00	-2,45
NM_021300.1	Ehox	ES cell derived homeobox containing gene (Ehox)	0,00	0,00	1,00	-2,46
NM_026594.1	Rpl39l	ribosomal protein L39-like	0,04	0,00	1,00	-2,46
NM_009951.2	Igf2bp1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	0,00	0,00	1,00	-2,47
BB365838.2	Tnn	tenascin N	0,03	0,00	1,00	-2,47
AA718109.1	Gm960	predicted gene 960	0,00	0,00	1,00	-2,48
NM_176844.3	Chrna5	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5	0,01	0,00	1,00	-2,48
NM_027491.1	Rragd	Ras-related GTP binding D	0,00	0,00	1,00	-2,48
BC024760.1	4930529M08Rik	RIKEN cDNA 4930529M08 gene	0,02	0,00	1,00	-2,49
BF011365.1	Dnahc12	dynein, axonemal, heavy chain 12	0,02	0,00	1,00	-2,49
AK049571.1	C430042M11Rik	RIKEN cDNA C430042M11 gene	0,00	0,00	1,00	-2,49
NM_011726.1	Xlr3a	X-linked lymphocyte-regulated 3a (Xlr3a)	0,00	0,00	1,00	-2,49
NM_173383.1	Dnd1	dead end homolog 1 (zebrafish)	0,00	0,00	1,00	-2,50
NM_021893.2	Cd274	CD274 antigen	0,03	0,00	1,00	-2,50
NM_198607.1	4930572J05Rik	RIKEN cDNA 4930572J05 gene	0,01	0,00	1,00	-2,50
NM_181590.2	Shq1	SHQ1 homolog (S. cerevisiae)	0,00	0,00	1,00	-2,50

ACCN	Gene Symbol	Genname	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_008430.1	Kcnk1	potassium channel, subfamily K, member 1	0,00	0,00	1,00	-2,50
NM_021459.2	Isl1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	0,00	0,00	1,00	-2,51
NM_015774.2	Ero1l	ERO1-like (S. cerevisiae)	0,04	0,00	1,00	-2,51
NM_010059.1	Dmc1	DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast)	0,00	0,00	1,00	-2,51
NM_007974.2	F2r1l	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0,00	0,00	1,00	-2,51
BC013672.1	Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	0,00	0,00	1,00	-2,52
M74753.1	Myh3	myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic	0,02	0,00	1,00	-2,52
NM_029674.1	Got1l1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1-like 1	0,01	0,00	1,00	-2,52
NM_009389.1	Tle3	transducin-like enhancer of split 3, homolog of Drosophila E(spl)	0,01	0,00	1,00	-2,52
AK010881.1	Wipi2	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	0,04	0,00	1,00	-2,52
NM_025572.1	2610528J11Rik	RIKEN cDNA 2610528J11 gene	0,05	0,00	1,00	-2,53
AA612185.1	Baz1a	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	0,00	0,00	1,00	-2,53
NM_011178.2	Prtn3	proteinase 3	0,03	0,00	1,00	-2,53
BE946949.1	Zyg11b	zyg-II homolog B (C. elegans)	0,00	0,00	1,00	-2,53
NM_025393.1	S100a14	S100 calcium binding protein A14	0,01	0,00	1,00	-2,53
U23921.1	Hspa4l	heat shock protein 4 like	0,00	0,00	1,00	-2,54
AK012978.1	Shq1	SHQ1 homolog (S. cerevisiae)	0,00	0,00	1,00	-2,54
M74515.1	Gabpa	GA repeat binding protein, alpha	0,01	0,00	1,00	-2,55
AK006179.1	1700020N01Rik	RIKEN cDNA 1700020N01 gene	0,00	0,00	1,00	-2,55
NM_027027.1	Asb9	ankyrin repeat and SOCS box-containing 9	0,00	0,00	1,00	-2,55
BQ550570.1			0,04	0,00	1,00	-2,55
NM_010074.2	Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	0,00	0,00	1,00	-2,55
AK015939.1	Hormad2	HORMA domain containing 2	0,04	0,00	1,00	-2,56
AK019495.1	Ddx10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10	0,02	0,00	1,00	-2,57
BB469950.2	Phb	prohibitin	0,01	0,00	1,00	-2,57
NM_016907.2	Spint1	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	0,02	0,00	1,00	-2,57

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_001001176.1	Taf9b	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	0,01	0,00	1,00	-2,57
NM_170591.1	Nupl1	nucleoporin like 1	0,05	0,00	1,00	-2,57
NM_008116.1	Ggt1	gamma-glutamyltransferase 1	0,00	0,00	1,00	-2,57
NM_025998.1	Nkain1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting ATPase interacting 1	0,00	0,00	1,00	-2,57
NM_145548.1	Cyp2j13	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 13	0,02	0,00	1,00	-2,58
NM_022983.2	Lpar3	lysophosphatidic acid receptor 3	0,01	0,00	1,00	-2,58
BB437522.2	Foxf1a	forkhead box F1a	0,00	0,00	1,00	-2,58
NM_023742.1	Dtx2	deltex 2 homolog (Drosophila)	0,00	0,00	1,00	-2,58
BC032960.1	Suv39h2	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)	0,02	0,00	1,00	-2,59
NM_172712.2	Uba6	ubiquitin-like modifier activating enzyme 6	0,02	0,00	1,00	-2,59
BQ174675.1	C1ql1	complement component 1, q subcomponent-like 1	0,00	0,00	1,00	-2,59
AF117382.1	Hic2	hypermethylated in cancer 2	0,01	0,00	1,00	-2,60
CD541541.1	LOC673430	zinc finger protein 160-like	0,03	0,00	1,00	-2,60
BE957117.1			0,00	0,00	1,00	-2,60
NM_027669.1	Sep 12	septin 12	0,00	0,00	1,00	-2,60
AI507010.1			0,00	0,00	1,00	-2,61
NM_010816.1	Morc1	microrchidia 1	0,01	0,00	1,00	-2,61
AK041237.1	Arl5b	ADP-ribosylation factor-like 5B	0,00	0,00	1,00	-2,62
AK017531.1	Herc3	hect domain and RLD 3	0,00	0,00	1,00	-2,62
NM_175449.3	Fam26f	family with sequence similarity 26, member F	0,03	0,00	1,00	-2,63
BE292026.1	Nfib	nuclear factor I/B	0,01	0,00	1,00	-2,63
AK014832.1	Dscaml1	Down syndrome cell adhesion molecule-like 1	0,03	0,00	1,00	-2,65
NM_007914.2	Ehf	ets homologous factor	0,00	0,00	1,00	-2,67
NM_031389.1	Nalp4c	leucine rich repeat and PYD containing 4C (Nalp4c)	0,00	0,00	1,00	-2,67
BG833093.1	Satb1	special AT-rich sequence binding protein 1	0,03	0,00	1,00	-2,68
NM_138673.1	Stab2	stabilin 2	0,05	0,00	1,00	-2,68
BC050805.1	Ttc25	tetratricopeptide repeat domain 25	0,01	0,00	1,00	-2,69
AK076976.1			0,00	0,00	1,00	-2,69
NM_031391.1	Gtf2a1	general transcription factor II A, 1	0,00	0,00	1,00	-2,69



ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_025781.1	Tmem170	transmembrane protein 170	0,03	0,00	1,00	-2,70
NM_146101.1	Habp2	hyaluronic acid binding protein 2	0,01	0,00	1,00	-2,70
NM_175363.2	Pphln1	periphilin 1	0,00	0,00	1,00	-2,70
AK016727.1	Zfp597	zinc finger protein 597	0,03	0,00	1,00	-2,70
NM_021893.2	Cd274	CD274 antigen	0,02	0,00	1,00	-2,70
BB729271.1			0,02	0,00	1,00	-2,71
AK129267.1	Synpo	synaptopodin	0,03	0,00	1,00	-2,71
NM_023781.3			0,01	0,00	1,00	-2,71
NM_024230.1	Smtnl1	smoothelin-like 1	0,00	0,00	1,00	-2,72
NM_029299.1	Spata19	spermatogenesis associated 19	0,02	0,00	1,00	-2,72
NM_199299.1	Phf15	PHD finger protein 15	0,01	0,00	1,00	-2,72
NM_172565.1	Klhl11	kelch-like 11 (Drosophila)	0,00	0,00	1,00	-2,73
BI695483.1	Phf17	PHD finger protein 17	0,00	0,00	1,00	-2,73
NM_147221.1	Glis1	GLIS family zinc finger 1	0,00	0,00	1,00	-2,73
NM_172693.2	Galnt12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12	0,01	0,00	1,00	-2,73
AV254043.2			0,02	0,00	1,00	-2,73
NM_178375.2	Zswim3	zinc finger, SWIM domain containing 3	0,01	0,00	1,00	-2,75
NM_019547.1	Rbm38	RNA binding motif protein 38	0,00	0,00	1,00	-2,76
BB520952.2			0,02	0,00	1,00	-2,76
NM_172565.1	Klhl11	kelch-like 11 (Drosophila)	0,01	0,00	1,00	-2,76
NM_027399.1	Steap1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	0,01	0,00	1,00	-2,78
BC057064.1	Klhdc10	kelch domain containing 10	0,00	0,00	1,00	-2,78
NM_170757.1			0,02	0,00	1,00	-2,79
NM_008708.1	Nmt2	N-myristoyltransferase 2	0,00	0,00	1,00	-2,79
AK052278.1	Mgat4a	mannoside acetylglucosaminyltransferase 4, isoenzyme A	0,01	0,00	1,00	-2,80
CA479032.1	1190003J15Rik	RIKEN cDNA 1190003J15 gene	0,01	0,00	1,00	-2,80
NM_029372.1	1700011F14Rik	RIKEN cDNA 1700011F14 gene	0,00	0,00	1,00	-2,80
BE915912.1	Necab3	N-terminal EF-hand calcium binding protein 3	0,00	0,00	1,00	-2,80
NM_018790.1	Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein	0,00	0,00	1,00	-2,82
NM_009864.1	Cdh1	cadherin 1	0,01	0,00	1,00	-2,82
BB513971.2	Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	0,04	0,00	1,00	-2,82

ACCN	Gene Symbol	Gencode	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_020596.1	Egr4	early growth response 4	0,02	0,00	1,00	-2,83
NM_029084.1	Slamf8	SLAM family member 8	0,00	0,00	1,00	-2,83
NM_177282.2	Mical2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	0,02	0,00	1,00	-2,84
NM_030052.2	Cox7b2	cytochrome c oxidase subunit VIIb2	0,01	0,00	1,00	-2,84
AI587854.1	Gm4984	predicted pseudogene 4984	0,01	0,00	1,00	-2,85
NM_028615.1	Dppa2	developmental pluripotency associated 2	0,00	0,00	1,00	-2,86
NM_010710.2	Lhx2	LIM homeobox protein 2	0,00	0,00	1,00	-2,87
NM_019636.1	Tbc1d1	TBC1 domain family, member 1	0,02	0,00	1,00	-2,87
AK076687.1	Sfmbt2	Scm-like with four mbt domains 2	0,01	0,00	1,00	-2,88
NM_011380.1	Six2	sine oculis-related homeobox 2 homolog (Drosophila)	0,01	0,00	1,00	-2,88
NM_011015.1	Orc1	origin recognition complex, subunit 1	0,02	0,00	1,00	-2,90
NM_023304.1	Fgf22	fibroblast growth factor 22	0,01	0,00	1,00	-2,90
AK053672.1	Dmxl2	Dmx-like 2	0,02	0,00	1,00	-2,90
AK016180.1	Atf7ip2	activating transcription factor 7 interacting protein 2	0,00	0,00	1,00	-2,91
AK039333.1	Naa30	N(alpha)-acetyltransferase 30, NatC catalytic subunit	0,02	0,00	1,00	-2,91
AB026802.1	Syt9	synaptotagmin IX	0,03	0,00	1,00	-2,92
BC058624.1	Ccdc36	coiled-coil domain containing 36	0,00	0,00	1,00	-2,92
BG082668.2			0,00	0,00	1,00	-2,93
NM_011035.1	Pak1	p21 protein (Cdc42/Rac)- activated kinase 1	0,04	0,00	1,00	-2,93
NM_008806.1	Pde6b	phosphodiesterase 6B, cGMP, rod receptor, beta polypeptide	0,00	0,00	1,00	-2,93
NM_178747.2	Gulo	gulonolactone (L-) oxidase	0,01	0,00	1,00	-2,95
W11780.1	Rap1gap	Rap1 GTPase-activating protein	0,00	0,00	1,00	-2,97
BB858483.1			0,00	0,00	1,00	-2,97
BC062937.1	Sall1	sal-like 1 (Drosophila)	0,00	0,00	1,00	-2,97
NM_011138.1	Pou2f2	POU domain, class 2, transcription factor 2	0,00	0,00	1,00	-2,98
NM_172840.2	Vwa2	von Willebrand factor A domain containing 2	0,00	0,00	1,00	-2,98
NM_027897.2	Rhpn2	rhophilin, Rho GTPase binding protein 2 (Rhpn2)	0,01	0,00	1,00	-2,98
NM_009173.1	Siah1b	seven in absentia 1B	0,03	0,00	1,00	-2,98

ACCN	Gene Symbol	Genname	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_013873.3	Sult4a1	sulfotransferase family 4A, member 1	0,00	0,00	1,00	-3,00
AK006959.1	1700080O16Rik	RIKEN cDNA 1700080O16 gene	0,02	0,00	1,00	-3,00
NM_028602.2	Tex19.1	testis expressed gene 19.1	0,00	0,00	1,00	-3,01
AK077262.1	Fam83g	family with sequence similarity 83, member G	0,00	0,00	1,00	-3,02
AK012596.1	Tdrkh	tudor and KH domain containing protein	0,03	0,00	1,00	-3,04
NM_007514.1	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, $\gamma^+$ system), member 2	0,00	0,00	1,00	-3,04
NM_025660.1	Ribc1	RIB43A domain with coiled-coils 1	0,01	0,00	1,00	-3,04
NM_010394.2	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	0,02	0,00	1,00	-3,04
NM_001004174.1	AA467197	expressed sequence AA467197	0,03	0,00	1,00	-3,04
NM_023663.3	Ripk4	receptor-interacting serine- threonine kinase 4	0,01	0,00	1,00	-3,06
AA882005.1	Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16	0,04	0,00	1,00	-3,06
AK005608.1	1700001L05Rik	RIKEN cDNA 1700001L05 gene	0,00	0,00	1,00	-3,07
AK015184.1			0,04	0,00	1,00	-3,07
NM_153072.1	Hus1b	Hus1 homolog b ( <i>S. pombe</i> )	0,00	0,00	1,00	-3,07
BC018510.1	Atf7ip2	activating transcription factor 7 interacting protein 2	0,02	0,00	1,00	-3,09
BC031147.1	Map3k15	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15	0,00	0,00	1,00	-3,10
NM_012033.2	Tinag	tubulointerstitial nephritis antigen	0,01	0,00	1,00	-3,10
AK017633.1	Sall4	sal-like 4 ( <i>Drosophila</i> )	0,01	0,00	1,00	-3,10
CF613235.1	Npw	neuropeptide W	0,00	0,00	1,00	-3,11
AK015606.1			0,00	0,00	1,00	-3,11
NM_001024145.1	Pla2g4f	phospholipase A2, group IVF	0,00	0,00	1,00	-3,11
NM_007755.1	Cpeb1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1	0,04	0,00	1,00	-3,12
NM_008141.2	Gnat2	guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 2 (Gnat2)	0,00	0,00	1,00	-3,13
NM_029352.3	Dusp9	dual specificity phosphatase 9	0,00	0,00	1,00	-3,13
NM_011854.1	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase- like 2	0,04	0,00	1,00	-3,13
NM_010014.2	Dab1	disabled homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	0,00	0,00	1,00	-3,13

ACCN	Gene Symbol	Genname	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_013585.1	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	0,04	0,00	1,00	-3,14
AK016553.1	Hsf2bp	heat shock transcription factor 2 binding protein	0,00	0,00	1,00	-3,14
BB048290.1			0,02	0,00	1,00	-3,14
NM_177307.2	Cyp4f39	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 39	0,02	0,00	1,00	-3,14
BM225062.2	Magea10	melanoma antigen family A, 10	0,02	0,00	1,00	-3,15
AK009986.1	Krt24	keratin 24	0,01	0,00	1,00	-3,17
U81317.1	Mobp	myelin-associated oligodendrocytic basic protein	0,04	0,00	1,00	-3,18
AK006257.1	1700023A16Rik	RIKEN cDNA 1700023A16 gene	0,00	0,00	1,00	-3,18
NM_028916.1	Efhc2	EF-hand domain (C-terminal) containing 2	0,00	0,00	1,00	-3,18
NM_031382.1	Tex16	testis expressed gene 16	0,01	0,00	1,00	-3,19
AI840762.1	Arhgap44	Rho GTPase activating protein 44	0,03	0,00	1,00	-3,20
BG066504.2	Ccnb1ip1	cyclin B1 interacting protein 1	0,00	0,00	1,00	-3,21
AK017146.1	Pgap1	post-GPI attachment to proteins 1	0,00	0,00	1,00	-3,21
NM_008578.1	Mef2b	myocyte enhancer factor 2B (Mef2b)	0,00	0,00	1,00	-3,21
NM_010598.2	Kcnab2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2 (Kcnab2)	0,00	0,00	1,00	-3,22
AY512920.1	Mdn1	midasin homolog (yeast)	0,01	0,00	1,00	-3,24
NM_007662.1	Cdh15	cadherin 15	0,03	0,00	1,00	-3,24
AV304616.2	Shh	sonic hedgehog	0,00	0,00	1,00	-3,25
NM_010205.1	Fgf8	fibroblast growth factor 8	0,00	0,00	1,00	-3,25
BC052527.1	Pank4	pantothenate kinase 4	0,02	0,00	1,00	-3,27
CN837332.1	Hsf5	heat shock transcription factor family member 5	0,01	0,00	1,00	-3,29
NM_011517.1	Sycp3	synaptonemal complex protein 3	0,03	0,00	1,00	-3,29
AK006612.1	Prss44	protease, serine, 44	0,03	0,00	1,00	-3,30
NM_178796.3	A530064D06Rik	RIKEN cDNA A530064D06 gene	0,04	0,00	1,00	-3,30
NM_016851.1	Irf6	interferon regulatory factor 6	0,00	0,00	1,00	-3,30
NM_145227.1	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	0,00	0,00	1,00	-3,30
NM_021343.1	Spata5	spermatogenesis associated 5	0,03	0,00	1,00	-3,31

ACCN	Gene Symbol	Gencode	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_031386.1	Tex14	testis expressed gene 14	0,02	0,00	1,00	-3,31
NM_145602.1	Ndrg4	N-myc downstream regulated gene 4	0,00	0,00	1,00	-3,32
BE944454.1			0,02	0,00	1,00	-3,33
NM_013528.2	Gfpt1	glutamine fructose-6- phosphate transaminase 1	0,02	0,00	1,00	-3,34
NM_198637.1	1700016K19Rik	RIKEN cDNA 1700016K19 gene	0,00	0,00	1,00	-3,35
NM_009477.1	Upp1	uridine phosphorylase 1 (Upp1)	0,00	0,00	1,00	-3,35
AI451225.1			0,04	0,00	1,00	-3,36
NM_031170.1	Krt8	keratin 8	0,00	0,00	1,00	-3,37
NM_139218.1	Dppa3	developmental pluripotency- associated 3	0,01	0,00	1,00	-3,39
NM_031261.1	Fthl17	ferritin, heavy polypeptide-like 17 (Fthl17)	0,00	0,00	1,00	-3,39
NM_198620.1	Rundc3b	RUN domain containing 3B	0,04	0,00	1,00	-3,41
NM_172451.1	Galnt6	UDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N- acetylgalactosaminyltransferase 6	0,01	0,00	1,00	-3,42
AK015130.1			0,00	0,00	1,00	-3,44
NM_009109.1			0,01	0,00	1,00	-3,44
NM_030061.1	Spink12	serine peptidase inhibitor, Kazal type 11	0,01	0,00	1,00	-3,44
BF319710.1	Rasa2	RAS protein activator like 2	0,01	0,00	1,00	-3,45
NM_010288.2	Gja1	gap junction protein, alpha 1	0,00	0,00	1,00	-3,45
NM_013580.2	Ldha	lactate dehydrogenase C	0,00	0,00	1,00	-3,46
NM_027407.2	Ica1l	islet cell autoantigen 1-like	0,01	0,00	1,00	-3,49
BG087102.2	Scml1	Vsex comb on midleg-like 1 (Drosophila)	0,02	0,00	1,00	-3,51
NM_015777.1	Igfbp1b	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1b	0,00	0,00	1,00	-3,51
NM_183178.1	Fsd1	fibronectin type 3 and SPRY domain-containing protein	0,00	0,00	1,00	-3,51
AK016695.1	4933406J08Rik	RIKEN cDNA 4933406J08 gene	0,00	0,00	1,00	-3,55
BQ174097.1			0,00	0,00	1,00	-3,56
AW492342.1	Crxos1	Crx opposite strand transcript 1	0,01	0,00	1,00	-3,56
BY714766.1	Als2cr11	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 11 (human)	0,00	0,00	1,00	-3,56
CN834482.1	Gtsf1	gametocyte specific factor 1	0,00	0,00	1,00	-3,58
NM_008234.2	Hells	helicase, lymphoid specific	0,02	0,00	1,00	-3,58
NM_001013756.1	Grhl3	grainyhead-like 3 (Drosophila)	0,01	0,00	1,00	-3,59

ACCN	Gene Symbol	Gencode	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
BC049168.1	Trnp1	TMF1-regulated nuclear protein 1	0,00	0,00	1,00	-3,61
CF425980.1	Hfm1	HFM1, ATP-dependent DNA helicase homolog (S. cerevisiae)	0,02	0,00	1,00	-3,62
NM_028937.1	Sohlh2	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2	0,01	0,00	1,00	-3,64
NM_029508.1	Pcgf5	polycomb group ring finger 5	0,01	0,00	1,00	-3,65
U06924.1	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	0,00	0,00	1,00	-3,65
NM_031374.1	Tex15	testis expressed gene 15	0,02	0,00	1,00	-3,65
AI118499.1			0,03	0,00	1,00	-3,68
AK036014.1	Grik3	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3	0,00	0,00	1,00	-3,68
BX630487.1			0,00	0,00	1,00	-3,69
NM_145357.1	BC023105	cDNA sequence BC023105	0,03	0,00	1,00	-3,71
NM_028913.1	Zfp819	zinc finger protein 819	0,00	0,00	1,00	-3,72
NM_057173.1	Lmo1	LIM domain only 1	0,00	0,00	1,00	-3,73
NM_016850.1	Irf7	interferon regulatory factor 7	0,00	0,00	1,00	-3,73
NM_008599.1	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	0,02	0,00	1,00	-3,73
BC094889.1	Chrn4	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 4	0,02	0,00	1,00	-3,76
AK019107.1	2410006F04Rik	RIKEN cDNA 2410006F04 gene	0,01	0,00	1,00	-3,76
NM_020622.1	Fam3b	family with sequence similarity 3, member B	0,05	0,00	1,00	-3,77
NM_020610.1	Nrip3	nuclear receptor interacting protein 3	0,00	0,00	1,00	-3,78
NM_026262.1	4930524B15Rik	RIKEN cDNA 4930524B15 gene	0,05	0,00	1,00	-3,79
NM_178386.2	Slc25a31	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 31	0,01	0,00	1,00	-3,79
BC056473.1	Nanos1	nanos homolog 1 (Drosophila)	0,01	0,00	1,00	-3,79
BC051084.1	Zbtb42	zinc finger and BTB domain containing 42	0,00	0,00	1,00	-3,82
NM_145890.1	Grhl1	grainyhead-like 1 (Drosophila)	0,05	0,00	1,00	-3,83
AK006739.1	Usp12	ubiquitin specific peptidase 12	0,03	0,00	1,00	-3,85
NM_027696.1	Mier1	mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)	0,01	0,00	1,00	-3,88
AI449690.1	Gm3858	predicted gene 3858	0,02	0,00	1,00	-3,88
NM_019981.1	Tex101	testis expressed gene 101	0,00	0,00	1,00	-3,94
NM_198601.1	Trim52	tripartite motif-containing 52	0,00	0,00	1,00	-3,97

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_027512.1	3830417A13Rik	RIKEN cDNA 3830417A13 gene	0,05	0,00	1,00	-3,98
AK033245.1	8030474K03Rik	RIKEN cDNA 8030474K03 gene	0,00	0,00	1,00	-3,99
BM198622.2	Kdm5b	lysine (K)-specific demethylase 5B	0,02	0,00	1,00	-4,00
NM_080470.1	Smc1b	structural maintenance of chromosomes 1B	0,00	0,00	1,00	-4,01
NM_013683.1	Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0,01	0,00	1,00	-4,04
NM_177013.2	Tmem229a	transmembrane protein 229A	0,00	0,00	1,00	-4,04
NM_013932.2	Ddx25	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 25	0,03	0,00	1,00	-4,07
AK015898.1	Rasd2	RASD family, member 2	0,00	0,00	1,00	-4,08
AK083512.1	Neto2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	0,01	0,00	1,00	-4,09
NM_030220.2	Sp2	Sp2 transcription factor	0,00	0,00	1,00	-4,10
NM_008500.1	Lhx6	LIM homeobox protein 6	0,00	0,00	1,00	-4,10
NM_012013.1	Figla	folliculogenesis specific basic helix-loop-helix	0,04	0,00	1,00	-4,11
NM_175296.3	Mael	maelstrom homolog (Drosophila)	0,01	0,00	1,00	-4,12
AK048125.1	4933411K20Rik	RIKEN cDNA 4933411K20 gene	0,00	0,00	1,00	-4,12
NM_022422.3	Gng13	guanine nucleotide binding protein 13, gamma (Gng13)	0,00	0,00	1,00	-4,20
AF401983.1	Zim2	zinc finger, imprinted 2	0,00	0,00	1,00	-4,21
BY731679.1	Tmem170b	transmembrane protein 170B	0,00	0,00	1,00	-4,27
AK004823.1	Phf15	PHD finger protein 15	0,00	0,00	1,00	-4,29
AK016522.1	Lonrf3	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	0,01	0,00	1,00	-4,29
NM_026680.2	Golt1a	golgi transport 1 homolog A (S. cerevisiae)	0,01	0,00	1,00	-4,31
NM_010663.1	Krt17	keratin 17	0,01	0,00	1,00	-4,37
AK007250.1	1700123I01Rik	RIKEN cDNA 1700123I01 gene	0,00	0,00	1,00	-4,37
NM_175326.2	D330045A20Rik	RIKEN cDNA D330045A20 gene	0,00	0,00	1,00	-4,40
NM_009877.1	Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	0,00	0,00	1,00	-4,42
NM_022435.2	Sp5	trans-acting transcription factor 5	0,02	0,00	1,00	-4,46
NM_009446.1	Tuba3	tubulin, alpha 3 (Tuba3)	0,00	0,00	1,00	-4,47
NM_183191.1	Plch1	phospholipase C, eta 1	0,01	0,00	1,00	-4,48
AK015063.1	Adad2	adenosine deaminase domain containing 2	0,03	0,00	1,00	-4,49
NM_009904.1	Clgn	calmegin	0,00	0,00	1,00	-4,49

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_023420.1	Col4a3bp	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	0,00	0,00	1,00	-4,50
NM_133351.1	Prss8	protease, serine, 8 (prostasin)	0,00	0,00	1,00	-4,50
BI692011.1	Atp10b	ATPase, class V, type 10B	0,01	0,00	1,00	-4,52
NM_011060.1	Padi3	peptidyl arginine deiminase, type III	0,00	0,00	1,00	-4,52
NM_009350.1	Adad1	adenosine deaminase domain containing 1 (testis specific)	0,00	0,00	1,00	-4,52
NM_021482.1	Syngn4	synaptogyrin 4	0,00	0,00	1,00	-4,52
BB185781.1			0,00	0,00	1,00	-4,52
NM_029509.2	Gbp8	guanylate-binding protein 8	0,02	0,00	1,00	-4,56
BG075960.2			0,04	0,00	1,00	-4,57
NM_178254.2	Tcf15	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	0,03	0,00	1,00	-4,59
NM_010713.1	Lhx8	LIM homeobox protein 8	0,00	0,00	1,00	-4,59
NM_016958.1	Krt14	keratin 14	0,00	0,00	1,00	-4,60
AK030316.1	Mtap7d2	MAP7 domain containing 2	0,01	0,00	1,00	-4,61
AK020619.1	9530062K07Rik	RIKEN cDNA 9530062K07 gene	0,04	0,00	1,00	-4,64
NM_173028.2	Vps13a	vacuolar protein sorting 13A (yeast)	0,02	0,00	1,00	-4,66
BF018919.1			0,02	0,00	1,00	-4,66
AK082309.1	C230036F13Rik	RIKEN cDNA C230036F13 gene	0,02	0,00	1,00	-4,66
NM_011253.1	Rbmy1a1	RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A1	0,01	0,00	1,00	-4,75
NM_178621.2	Phyhipl	phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein-like	0,01	0,00	1,00	-4,81
BF152648.1	Prr19	proline rich 19	0,01	0,00	1,00	-4,82
AW061221.1			0,00	0,00	1,00	-4,83
NM_031390.1	Pramel3	preferentially expressed antigen in melanoma-like 3 (Pramel3)	0,02	0,00	1,00	-4,83
NM_008588.1	Mesp1	mesoderm posterior 1	0,01	0,00	1,00	-4,84
NM_009705.1	Arg2	arginase type II	0,00	0,00	1,00	-4,90
NM_009623.1	Adcy8	adenylate cyclase 8	0,03	0,00	1,00	-4,93
NM_011719.2	Wnt9b	wingless-type MMTV integration site 9B	0,02	0,00	1,00	-4,93
NM_009170.2	Shh	sonic hedgehog	0,01	0,00	1,00	-4,93
NM_023386.3			0,00	0,00	1,00	-4,93
NM_018738.2	Igtp	interferon gamma induced GTPase	0,03	0,00	1,00	-5,03
NM_027721.1	Katnal2	katanin p60 subunit A-like 2	0,04	0,00	1,00	-5,03



ACCN	Gene Symbol	Genname	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
BY756231.1	Gm949	predicted gene 949	0,00	0,00	1,00	-5,05
AF202039.1	Nkx2-4	NK2 transcription factor related, locus 4 (Drosophila)	0,01	0,00	1,00	-5,07
BC042709.1	Aim1l	absent in melanoma 1-like	0,00	0,00	1,00	-5,07
NM_023729.2	Asz1	ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain containing 1	0,02	0,00	1,00	-5,13
NM_011909.1	Usp18	ubiquitin specific peptidase 18	0,00	0,00	1,00	-5,15
NM_010501.1	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (Ifit3)	0,03	0,00	1,00	-5,18
AK052469.1	Igtp	interferon gamma induced GTPase	0,00	0,00	1,00	-5,27
NM_174993.1	Fmr1nb	fragile X mental retardation 1 neighbor	0,00	0,00	1,00	-5,28
NM_009793.1	Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	0,00	0,00	1,00	-5,32
NM_181548.2	Eras	ES cell-expressed Ras	0,00	0,00	1,00	-5,34
NM_025493.2	1700018B24Rik	enhancer of rudimentary homolog pseudogene	0,00	0,00	1,00	-5,39
NM_010029.1	Ddx4	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	0,03	0,00	1,00	-5,40
NM_133194.2	Scml2	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)	0,04	0,00	1,00	-5,41
NM_031385.1	Tex18	testis expressed gene 18	0,02	0,00	1,00	-5,42
NM_001002238.1	Tdrd1	tudor domain containing 1	0,02	0,00	1,00	-5,48
NM_008620.2	Gbp4	guanylate binding protein 4	0,02	0,00	1,00	-5,50
AK082869.1	C430002E04Rik	RIKEN cDNA C430002E04 gene	0,00	0,00	1,00	-5,54
NM_031259.1	Nxf2	nuclear RNA export factor 2	0,01	0,00	1,00	-5,54
NM_177567.2	BC049762	cDNA sequence BC049762	0,00	0,00	1,00	-5,67
BQ257921.1			0,03	0,00	1,00	-5,70
NM_011516.1	Sycp1	synaptonemal complex protein 1	0,00	0,00	1,00	-5,79
NM_009571.1	Zfy2	zinc finger protein 2, Y linked (Zfy2)	0,00	0,00	1,00	-5,84
NM_021308.1	Piwi2	piwi-like homolog 2 (Drosophila)	0,03	0,00	1,00	-5,89
BE199336.1	Gm4841	predicted gene 4841	0,02	0,00	1,00	-5,94
NM_025687.1	Tex12	testis expressed gene 12	0,00	0,00	1,00	-5,94
NM_010021.2	Dazl	deleted in azoospermia-like	0,04	0,00	1,00	-6,04
NM_010416.1	Hemt1	hematopoietic cell transcript 1 (Hemt1)	0,00	0,00	1,00	-6,07
NM_013914.2	Snai3	snail homolog 3 (Drosophila)	0,00	0,00	1,00	-6,11

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
NM_013894.1	Rnf17	ring finger protein 17	0,01	0,00	1,00	-6,11
NM_008900.1	Pou3f3	POU domain, class 3, transcription factor 3	0,00	0,00	1,00	-6,13
NM_031493.1	Xlr5c	X-linked lymphocyte-regulated 5C	0,02	0,00	1,00	-6,16
AK007253.1	Rhox13	reproductive homeobox 13	0,00	0,00	1,00	-6,16
BY707078.1	1700086P04Rik	RIKEN cDNA 1700086P04 gene	0,00	0,00	1,00	-6,19
NM_008331.1	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0,01	0,00	1,00	-6,28
NM_009330.1	Hnf1b	HNF1 homeobox B	0,00	0,00	1,00	-6,32
BG083749.2			0,00	0,00	1,00	-6,34
BY706965.1			0,00	0,00	1,00	-6,43
NM_008069.3	Gabrb1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 1	0,02	0,00	1,00	-6,48
NM_028958.2	Taf7l	TAF7-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)- associated factor	0,03	0,00	1,00	-6,66
NM_010252.3	Gabrg1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 1	0,00	0,00	1,00	-6,67
NM_145890.1	Grhl1	grainyhead-like 1 (Drosophila)	0,01	0,00	1,00	-6,83
BC004721.1	Eaf2	ELL associated factor 2	0,00	0,00	1,00	-6,85
NM_172469.1	Clic6	chloride intracellular channel 6	0,02	0,00	1,00	-6,92
NM_001001714.1	Sohlh1	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1	0,00	0,00	1,00	-6,98
NM_020018.1	Magea5	melanoma antigen, family A, 5 (Magea5)	0,03	0,00	1,00	-7,00
NM_025503.1	1700029P11Rik	RIKEN cDNA 1700029P11 gene	0,01	0,00	1,00	-7,02
AV281902.2	4933427D06Rik	RIKEN cDNA 4933427D06 gene	0,00	0,00	1,00	-7,06
NM_029948.1	Pramef12	PRAME family member 12	0,01	0,00	1,00	-7,26
NM_009482.1	Utf1	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	0,02	0,00	1,00	-7,27
NM_029660.1	Rbmxl2	RNA binding motif protein, X- linked-like 2	0,02	0,00	1,00	-7,27
NM_027732.1	Dmrtc2	doublesex and mab-3 related transcription factor like family C2	0,00	0,00	1,00	-7,31
D49658.1	Lhx8	LIM homeobox protein 8	0,01	0,00	1,00	-7,42
NM_175200.2	Als2cr11	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 11 (human)	0,02	0,00	1,00	-7,44
NM_028927.1	Tktl2	transketolase-like 2	0,00	0,00	1,00	-7,51

ACCN	Gene Symbol	Gename	tTest pvalue	RP pval down	RP pval up	FC KO WT
AK078845.1	Ube2e3	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3, UBC4/5 homolog (yeast)	0,00	0,00	1,00	-7,56
NM_021792.3	ligp1	interferon inducible GTPase 1 (ligp1)	0,03	0,00	1,00	-7,67
NM_026489.1	Hormad1	HORMA domain containing 1	0,02	0,00	1,00	-7,68
NM_018734.2	Gbp3	guanylate binding protein 3	0,00	0,00	1,00	-7,69
NM_021792.3	ligp1	interferon inducible GTPase 1	0,02	0,00	1,00	-8,13
AK009417.1	Klrg2	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 2	0,02	0,00	1,00	-8,42
NM_011579.2	Tgtp1	T-cell specific GTPase 1	0,03	0,00	1,00	-8,44
AI196437.1	Gm4951	predicted gene 4951	0,00	0,00	1,00	-8,59
NM_011726.1	Xlr3a	X-linked lymphocyte-regulated 3A	0,00	0,00	1,00	-8,80
AK014411.1	Sycp2	synaptonemal complex protein 2	0,01	0,00	1,00	-8,90
AK005953.1	1700013H16Rik	RIKEN cDNA 1700013H16 gene	0,00	0,00	1,00	-9,22
BE957236.1	C030009O12Rik	RIKEN cDNA C030009O12 gene	0,02	0,00	1,00	-9,32
NM_011023.2	Otx1	orthodenticle homolog 1 (Drosophila)	0,03	0,00	1,00	-9,38
NM_177772.2	Bpil2	bactericidal/permeability- increasing protein-like 2	0,01	0,00	1,00	-9,47
BB014105.2	Rnf17	ring finger protein 17	0,01	0,00	1,00	-9,64
NM_175017.2	4933427D06Rik	RIKEN cDNA 4933427D06 gene	0,01	0,00	1,00	-9,68
NM_021394.1	Zbp1	Z-DNA binding protein 1	0,00	0,00	1,00	-9,70
NM_009434.2	Phlda2	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	0,00	0,00	1,00	-10,41
NM_025723.1	4921515J06Rik	RIKEN cDNA 4921515J06 gene	0,00	0,00	1,00	-10,82
NM_013496.1	Crabp1	cellular retinoic acid binding protein I	0,00	0,00	1,00	-12,69
NM_172521.1	BC125332	cDNA sequence BC125332	0,01	0,00	1,00	-12,88
BC052024.1	Sox3	SRY-box containing gene 3	0,00	0,00	1,00	-13,30
AI591895.1			0,02	0,00	1,00	-14,41
NM_031384.1	Tex11	testis expressed gene 11	0,02	0,00	1,00	-15,44
NM_010445.1	Hmx1	H6 homeobox 1	0,04	0,00	1,00	-20,53
NM_009292.1	Stra8	stimulated by retinoic acid gene 8	0,03	0,00	1,00	-26,70
AF020191.1	Dmrtb1	DMRT-like family B with proline-rich C-terminal, 1	0,04	0,00	1,00	-68,15

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

*Sarah Giese*

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. Brehm, möchte ich ganz herzlich danken für das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Überlassen des Themas, für seine freundschaftliche Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten und Erstellen dieser Dissertation, für seine Ratschläge, und den unersetzbaren Optimismus und seine Geduld.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Bergmann aussprechen für seine Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Anregungen und kritischen Beurteilungen beim Erstellen dieser Arbeit, Postern und Veröffentlichungen.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgesellschaft (BR 3365/2-1) für ihre finanzielle Unterstützung im Rahmen der Klinischen Forschergruppe KFO 181, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Noch ein herzliches Dankeschön möchte ich den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Griswold (School of Molecular Biosciences, Washington State University, Pullman, USA), Herrn Prof. Zarkower (Department of Genetics, University of Minnesota, Minneapolis, USA) und Prof. Cooke (MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, UK) aussprechen für die Bereitstellung verschiedener Antikörper.

Bei Herrn Dr. Hossain, Prof. Dr. Chakraborty und Herrn Dr. Tchatalbachev (Institut für Mikrobiologie, JLU-Giessen) für die Durchführung der Microarray-Analyse, mit einem besonderen Dank an Herrn Dr. Hossain und Frau Dr. Markmann für die Hilfe bei der Planung und Auswertung der Versuche.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär -Anatomie, -Histologie und -Embryologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Besonders bei Frau J. Dern-Wieloch, Frau A. Hax, Frau A. Hild und Frau S. Schubert-Porth bedanke ich mich herzlich für ihre Einführung ins Labor, ihre Hilfestellung und zahlreichen Tipps.

Meinen Mitdoktoranden K. Weider, C. Ratzenböck, D. Fietz, C. Reich, S. Günther und B. Wapelhorst tausend Dank für die schöne Zeit, die Unterstützung moralischer und praktischer Art, ohne welche diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Ein Riesendankeschön auch an Merhan für die insgesamt viermalige Rettung der Festplatte meines Computers und dieser Arbeit☺.

Vielen Dank auch meinen Eltern, Geschwistern und Mark, dass sie mich immer unterstützt haben, immer ein offenes Ohr hatten, nie an mir gezweifelt haben und mir ab und zu gezeigt habt, welche Dinge wirklich wichtig sind. DANKE.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5909-5



Cover Photo: © anyaiavanova - Fotolia.com